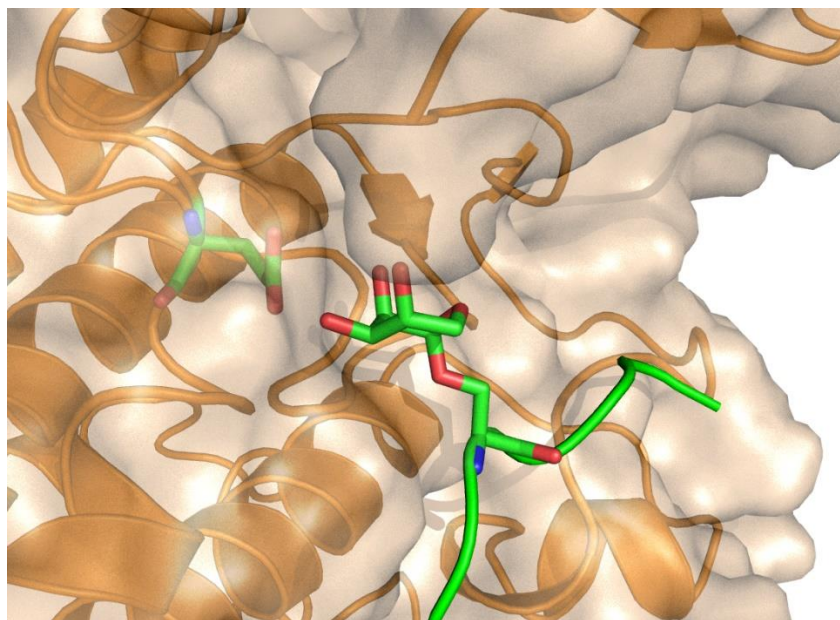


Erkennen von Proteinoberflächen durch ungewöhnliche Substrat-analoge Inhibitoren am Beispiel der cAMP-abhängigen Proteinkinase A



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
JANIS MÜLLER
aus
Gelnhausen

Marburg an der Lahn, 2017

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. Klebe von April 2014 bis Oktober 2017 am Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Dem Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation eingereicht am: 31.10.2017

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerhard Klebe

Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus Reuter

Tag der mündlichen Prüfung am: 19.12.2017

Hochschulkennziffer 1180

Für meine Familie.

Für meine Freunde.

Für Maria, die beides gleichzeitig ist.

„Truth is not what you want it to be;

It is what it is,

and you must bend to its power

or live a lie.”

Übersetzung aus dem Gorin no Sho von Miyamoto Musashi

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	XIII
I Einleitung.....	1
II Kenntnisstand	3
1. Proteinkinasen.....	3
1.1 Allgemeines.....	3
1.2 Arten von Proteinkinasen	4
1.3 Konservierte Strukturelemente der AGC-Kinasen.....	5
1.4 Mechanismus der Phosphorylierung	7
1.5 Vorkommen im Körper	8
1.6 Durch Proteinkinasen beeinflusste Krankheiten	9
1.7 Bekannte Kinaseinhibitoren	9
1.7.1 <i>Hinge</i> -Binder.....	9
1.7.2 Peptidische Inhibitoren	11
1.8 Affinitätsbestimmung an Kinasen durch Phosphorylierungsassays.....	12
1.9 cAMP-abhängige Proteinkinase A	13
1.9.1 Allgemeines	13
1.9.2 Struktur und Regulationsmechanismus.....	13
1.9.3 Aufgaben im Körper	16
2. Assays	16
2.1 <i>Thermal-Shift</i> -Assay (TSA).....	16
2.2 Mikroskalierte Thermophorese (MST).....	18
III Aufgabenstellung Beiträge der Kooperationspartner	21
IV Ergebnisse und Diskussion	25
1. Rekombinante Produktion der cAMP-abhängigen Proteinkinase A aus chinesischen-Hamster-Ovarien (CHO PKA)	25
2. Strukturvorschläge von Adamantyl-Peptiden mittels MD-Simulationen	25
3. Etablierung von Bindungsassays	25
3.1 Beurteilung von geeigneten Assay-Methoden.....	25
3.2 Erste Versuche zur Etablierung des Mikroskalierten Thermophorese-Assays	26
3.2.1 Fluoreszenzmarkierung („ <i>Labeling</i> “) der Proteinkinase A.....	26

3.2.2 Reduzierung von Aggregations- und Adhäsionseffekten	28
3.2.3 Erste Messungen mit peptidischen Liganden	30
3.3 Ermittlung korrekter Bedingungen mittels eines <i>Thermal-Shift</i> - Assays (TSA).....	32
3.3.1 Bestimmung der Proteinstabilität zur Etablierung neuer Messbedingungen	32
3.3.2 TSA-Versuche mit optimierten Messbedingungen.....	36
3.4 Bestimmung von Bindungsaffinitäten im MST unter den optimierten Bedingungen.....	38
4. Ergebnisse des <i>Thermal-Shift</i> - und Thermophorese-Assays	40
4.1 Peptidische Liganden mit Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren.....	40
4.1.1. Gemessene Affinitäten und Stabilisierungseffekte	40
4.1.2 Diskussion der Messwerte für PKI ⁵⁻²⁴	41
4.1.3 Diskussion der Messwerte für PKI ⁵⁻²²	42
4.1.4 Diskussion der Messwerte für PKI(RBS ¹³) ⁵⁻²²	42
4.1.5 Diskussion der Messwerte für PKI(RBS ¹⁸) ⁵⁻²²	43
4.1.6 Diskussion der Messwerte für PKI(RBS ²⁰) ⁵⁻²²	44
4.1.7 Diskussion der Messwerte für PKI(RBT ¹⁶) ⁵⁻²²	45
4.1.8 Diskussion der Messwerte für PKI(RBS ¹⁹) ⁵⁻²²	45
4.1.9 Diskussion der Messwerte für PKI(RBS ¹⁷) ⁵⁻²²	45
4.1.10 Diskussion der Messwerte für PKI(RBS ²¹) ⁵⁻²²	46
4.1.11 Diskussion der Messwerte für PKI(BAR ¹⁸) ⁵⁻²²	46
4.1.12 Fazit zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten und stabilisierenden Effekte von peptidischen Liganden mit Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren.....	47
4.2 Peptidische Liganden mit Adamantyl-Aminosäuren.....	47
4.2.1 Gemessene Affinitäten und Stabilisierungseffekte	47
4.2.2 Diskussion der Messwerte für PKI((S)-SC ¹⁷) ⁵⁻²²	48
4.2.3 Diskussion der Messwerte für PKI(BB1 ^{15,16}) ⁵⁻²²	49
4.2.4 Diskussion der Messwerte für PKI((S)-SC ²¹¹) ⁵⁻²²	49
4.2.5 Diskussion der Messwerte für PKI((S)-SC1 ⁶) ⁵⁻²²	50

4.2.6 Fazit zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten und stabilisierenden Effekte von peptidischen Liganden mit Adamantyl-Aminosäuren	50
4.3 Fasudil-Derivate	51
4.3.1 Gemessene Affinitäten und Stabilisierungseffekte	51
4.3.2 Diskussion der Messwerte für Fasudil	52
4.3.3 Diskussion der Messwerte für BFS	52
4.3.4 Diskussion der Messwerte für BFF	52
4.3.5 Fazit zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten und stabilisierenden Effekte von Fasudil-Derivaten	53
4.4 Adenosinphosphate	53
4.4.1 Gemessene Affinitäten und Stabilisierungseffekte	53
4.4.2 Diskussion der Affinitäten	54
4.4.3 Diskussion der (de-)stabilisierenden Effekte	54
4.4.4 Fazit zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten und stabilisierenden Effekte von Adenosinphosphaten	55
5. Kristallisation der PKA	56
5.1 Optimierung der Kristallisationsbedingungen in der Serie der Peptide mit Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren mit und ohne Fasudil-Derivate	56
5.2 Optimierung der Kristallisationsbedingungen in der Serie der Peptide mit Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren mit Adenosinphosphaten	58
5.3 Optimierung der Kristallisationsbedingungen in der Serie des fragmentbasierten Designs von Komplexen	59
5.4 Optimierung der Kristallisationsbedingungen in der Serie der Peptide mit Adamantyl-Aminosäuren	59
5.5 Optimierung der Bedingungen für fragile Kristalle	59
5.6 Optimierung der <i>Soaking</i> -Bedingungen	60
5.7 Erhaltene Kristallstrukturen	61
6. Diskussion der Kristallstrukturen	63
6.1 Ligandeninduzierte Effekte durch Einführung von Peptiden oder <i>Hinge</i> -Bindern	63
6.1.1 Durchgeführte Strukturbestimmungen	63

6.1.2 Strukturvergleich der <i>apo</i> -PKA mit dem PKA-Fasudil-Komplex.....	63
6.1.3 Strukturvergleich der <i>apo</i> -PKA mit dem PKA-PKI ⁵⁻²⁴ -Komplex	65
6.2 Effekt der Verkürzung von PKI ⁵⁻²⁴ auf PKI ⁵⁻²²	67
6.3 Einführung von Ribo- und Boronsäure Aminosäuren in PKI ⁵⁻²²	71
6.3.1 Überblick.....	71
6.3.2 Vergleich der Strukturen von PKI ⁵⁻²² und PKI(RBS ¹³) ⁵⁻²²	71
6.3.3 Vergleich der Strukturen von PKI ⁵⁻²² und PKI(RBS ¹⁸) ⁵⁻²²	75
6.3.4 Vergleich der Strukturen von PKI ⁵⁻²² und PKI(RBS ²⁰) ⁵⁻²²	77
6.3.5 Vergleich der Strukturen von PKI ⁵⁻²² und PKI(RBT ¹⁶) ⁵⁻²²	79
6.3.6 Beurteilung der Eignung von PKI(RBS ¹⁹) ⁵⁻²² , PKI(RBS ¹⁷) ⁵⁻²² und PKI(RBS ²¹) ⁵⁻²² zur Verknüpfung von ATP- und Peptid-Bindetasche	80
6.3.7 Vergleich der Strukturen von PKI ⁵⁻²² und PKI(BAR ¹⁸) ⁵⁻²²	80
6.4 Versuche zur Verknüpfung von Ribo-Aminosäuren mit Boronsäure-Fasudilen	83
6.4.1 Überblick.....	83
6.4.2 Versuche zur Verknüpfung von PKI(RBS ¹⁸) ⁵⁻²² mit Boronsäure-Fasudilen	83
6.4.3 Versuche zur Verknüpfung von PKI(RBS ²⁰) ⁵⁻²² mit Boronsäure-Fasudilen	87
6.4.4 Versuche zur Verknüpfung von PKI(RBS ¹⁷) ⁵⁻²² mit Boronsäure-Fasudilen	90
6.4.5 Versuche zur Verknüpfung von PKI(RBS ²¹) ⁵⁻²² mit Boronsäure-Fasudilen	93
6.5 Ligandeninduzierte Effekte auf Peptide durch Einführung von Fasudil-Derivaten	95
6.5.1 Allgemein.....	95
6.5.2 Ligandeninduzierte Effekte auf PKI ⁵⁻²² durch Einführung von Fasudil-Derivaten.....	96
6.5.3 Ligandeninduzierte Effekte auf PKI(RBS ¹³) ⁵⁻²² durch Einführung von Fasudil-Derivaten.....	99
6.5.4 Ligandeninduzierte Effekte auf PKI(RBT ¹⁶) ⁵⁻²² durch Einführung von Fasudil-Derivaten.....	102

6.5.5 Ligandeninduzierte Effekte auf PKI(BAR ¹⁸) ⁵⁻²² durch Einführung von Fasudil-Derivaten.....	106
6.6 Ligandeninduzierte Effekte auf Fasudil-Derivate durch variierte Peptide....	109
6.6.1 Allgemein.....	109
6.6.2 Ligandeninduzierte Effekte auf Fasudil durch Peptide.....	109
6.6.3 Ligandeninduzierte Effekte auf BFS durch Peptide	111
6.6.4 Ligandeninduzierte Effekte auf BFF durch Peptide	113
6.7 Fazit zur Verknüpfung von Boronsäure-Fasudilen mit Ribo-Aminosäuren .	114
6.8 Versuche zur Verknüpfung von Adenosinphosphaten mit Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren.....	115
6.8.1 Allgemein.....	115
6.8.2 Versuche zur Interaktion von Adenosinphosphaten mit PKI(RBS ¹⁸) ⁵⁻²²	116
6.8.3 Versuche zur Interaktion von Adenosinphosphaten mit PKI(RBS ²⁰) ⁵⁻²²	117
6.8.4 Versuche zur Interaktion von Adenosinphosphaten mit PKI(BAR ¹⁸) ⁵⁻²²	121
6.9 Fazit zur Verknüpfung von Adenosinphosphaten mit Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren.....	122
6.10 Versuche zur Kristallisation mit Fragmenten.....	122
6.11 Einführung von Adamantyl-Aminosäuren	124
6.12 Fazit	128
7. Korrelation der Assay-Ergebnisse und der Kristallstrukturen	128
V Zusammenfassung	130
VI Material und Methoden.....	132
1. Materialien	132
1.1 Chemikalien.....	132
1.2 Geräte	135
1.3 Lösungen, Puffer und Medien	139
1.4 Verwendete Software	146
2. Methoden	147
2.1 SDS-Gelelektrophorese	147
2.2 Sterilisation.....	148

2.3 Rekombinante Produktion der cAMP abhängigen Proteinkinase A aus chinesischen Hamster-Ovarien (CHO PKA)	148
2.3.1 Transformation von Zellen und Herstellung von Glycerol-Stocks... ..	148
2.3.2 Wachstum der Zellen mit Übernachtskultur.....	149
2.3.3 Wachstum der Zellen ohne Übernachtskultur	150
2.3.4 Aufschluss der Zellen	150
2.3.5 Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie.....	151
2.3.6 Entfernung des Hexahistidin-Affinitätsmarkers	152
2.3.7 Aufreinigung mittels inverser Affinitätschromatographie	153
2.3.8 Aufreinigung mittels Kationenaustauschchromatographie	154
2.4 Konzentrationsbestimmung.....	156
2.5 Mikroskalierter Thermophorese-Assay (MST)	156
2.6 <i>Thermal-Shift</i> -Assay (TSA).....	162
2.7 (Co-)Kristallisation der PKA.....	165
2.8 „Soaking“.....	167
2.9 „Seeding“	168
2.10 Quervernetzung von Kristallen mittels Glutardialdehyd.....	168
2.11 Einfrieren der Proteinkristalle	169
2.12 Testen der Proteinkristalle	169
2.13 Datensammlung und Auswertung	171
2.14 Molekulardynamik-Simulationen.....	171
VII Literaturverzeichnis	173
VIII Danksagung	178
IX Anhang	179
Eidesstattliche Erklärung.....	195

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Vor Maßeinheiten: mikro (10^{-6})
Å	Ångström (10^{-10} m)
ADP	Adenosinphosphat
AG	Arbeitsgruppe
Ala	Alanin
ALV	Aviärer Leukosevirus
AMP	Adenosinmonophosphat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Referenzeinheit der Fluoreszenzlöschung (<i>Arbitrary Unit</i>)
BAR	Boronsäure-Arginin-Analoga (Boronic Acid Arginin(R))
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (Synchrotron in Berlin)
BFF	Boronsäure-Fasudil-Flexibel
BFS	Boronsäure-Fasudil
Bis-Tris	Bis (2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Bovines Serum-Albumin
c	Konzentration
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CHO	Chinesische Hamster-Ovarien
CML	chronisch myeloische Leukämie
CSD	Cambridge Structural Database (Kleinmoleküldatenbank)
d	Schichtdicke
d.h.	das heisst
Da	Dalton
demin.	demineralisiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
Dr.	Doktor
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EtOH	Ethanol
Fc	berechneter Strukturfaktor
Fo	beobachteter Strukturfaktor
g	bei Masseangaben: Gramm
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
His ₆	Hexa-Histidin
IEX	Ionenaustausch (<i>Ion-Exchange</i>)
Ile	Isoleucin

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie (<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>)
k	vor Maßeinheiten: Kilo (10^3)
K_D	Bindungskonstante
K_I	Inhibitorische Konstante
L	Liter
LC	<i>Liquid for Crystalization</i>
LiCl	Lithiumchlorid
m	vor Maßeinheiten: milli (10^{-3}), bei Längenangaben: Meter
MBT	Mes-Bis-Tris
MD	Molekulardynamik
Mega 8	N-Octanoyl-N-methylglucamine
MeOH	Methanol
MES	Morpholinoethansulfonsäure
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute
MPD	2-methyl-2,4-pentandiol
MST	Mikroskalierte Thermophorese
n	Vor Maßeinheiten: nano (10^{-9})
Na_2ATP	ATP-Natriumsalz
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	RCSB Protein Databank (Proteindatenbank)
Phe	Phenylalanin
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKI	Proteinkinase Inhibitor
psi	<i>Pressure per square inch</i>
RBS	Riboserin
RBT	Ribothreonin
R_{free}	Freier R-Wert
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
R_{work}	Arbeits R-Wert
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
Ser	Serin
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (<i>Surface Plasmon Resonance Spectroscopy</i>)
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEV	<i>Tobacco-Etch-Virus</i>
Thr	Threonin
T_m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
TSA	<i>Thermal-Shift-Assay</i>
Tyr	Tyrosin
u.ä.	und ähnliches
x g	vielfaches der Erdbeschleunigung g
ΔT	Schmelzpunktänderung

I Einleitung

Die Entstehung vieler Krankheiten wie beispielsweise Diabetes, Krebs oder neurologische Defekte wird maßgeblich durch eine fehlerhafte Regulierung der Signaltransduktion in den Zellen beeinflusst. Ein großer Teil der Signalweiterleitung wird durch die Phosphorylierung von Proteinen erreicht, die somit aktiviert oder inaktiviert werden.^{[1][2]} Dieser Vorgang wird durch die Familie der Proteinkinasen vollzogen.^{[3][4]}

Proteinkinasen erfüllen alle dieselbe Aufgabe, nämlich die Übertragung einer γ -Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf die Seitenkette eines Serins, Threonins oder Tyrosins eines peptidischen Substrates.^{[3][4]} Aufgrund der hochkonservierten Funktion dieser Proteinfamilie sind viele strukturelle Faktoren der einzelnen Mitglieder ebenfalls hochkonserviert.^{[2][5]} Dieser ähnliche Aufbau erschwert die Entwicklung neuer Medikamente zur Inhibition von Proteinkinasen, da viele potenzielle Inhibitoren, vor allem wenn sie kompetitiv die ATP-Bindestelle belegen, dadurch eine unzureichende Selektivität aufweisen und viele Kinasen gleichzeitig modulieren.^{[5][6]} Dies führt zu einer hohen Anzahl von Nebenwirkungen. Nichtsdestotrotz sind Kinasen weiterhin ein attraktives Ziel für die Entwicklung neuartiger Medikamente, wie das Beispiel von Imatinib zeigt. Bei Imatinib handelt es sich um einen selektiven Tyrosinkinaseinhibitor, der zur Behandlung von chronischer myeloischer Leukämie (CML) verwendet wird. Er inhibiert nur eine Mutationsvariante der Abl-Tyrosinkinase, die bei fast allen an CML erkrankten Personen auftritt, und ist in der Lage die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten deutlich zu steigern.^[3] Da die Bindung von Peptiden an Kinasen deutlich selektiver als die Bindung von ATP ist, bietet die Verwendung peptidischer Inhibitoren einen vielversprechenden Ansatzpunkt für weiteres Wirkstoffdesign.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mehrere Konzepte zur Entwicklung neuer selektiver peptidischer Inhibitoren für Proteinkinasen entwickelt und mithilfe von Bindungsassays, Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse verifiziert werden. In Kooperation mit den Arbeitsgruppen GEYER, DEHNEN und SCHREINER sollten nicht-natürliche Aminosäuren in Peptide eingeführt werden, um auf neue, von der Natur nicht eingesetzte Molekülbausteine zurückzugreifen, die beispielsweise Eigenschaften wie eine erhöhte Lipophilie oder nach besonderen Prinzipien gebildete Geometrien erlauben.

In diesem Zusammenhang sollte versucht werden, die Verknüpfung von peptidischen und nicht-peptidischen substratähnlichen Molekülkomponenten innerhalb der Bindetasche nach Art eines sich selbst findenden Komplexes („*Self-Assembly-Complex*“) zu erreichen, um neben der erhöhten Peptidselektivität Vorteile aus der hohen Affinität von nicht-Peptid-Substraten zu ziehen. Hinsichtlich der Steigerung der Bindungsaffinitäten erscheint das Prinzip ebenfalls attraktiv. Das Verknüpfen von zwei inhibitorischen Bindungskomponenten innerhalb der Bindetasche gilt als besonders erfolgsversprechend zur Steigerung von Affinitäten, sofern keine signifikanten Einbußen für die Bindungsverknüpfung (so genanntes „*Merging*“) eingegangen werden müssen, da aus entropischen Gründen ein zusätzlicher Bindungsgewinn erzielbar ist. Die Fixierung von vor der Proteinbindung unabhängigen Teilchen erfordert den Verlust von translatorischen und rotatorischen Freiheitsgraden, die als Preis durch die freie Bindungsenthalpie aufgebraucht werden muss. Bei drei unabhängigen Komponenten, wie der Bindung eines peptidischen sowie eines nichtpeptidischen Ligandenbausteins an das Zielprotein (im Fall dieses Projektes der Proteinkinase A) ist dieser Betrag umso höher. Finden sich diese Komponenten allerdings in einem energie günstigen Schritt von selbst und binden praktisch als vororganisiertes „Supermolekül“ an das Protein, so kann durch diese Reduktion der Freiheitsgrade des Systems ein Affinitätsgewinn erzielt werden. Dabei können Wassermoleküle, die aus den Solvathüllen der einzelnen Bindungspartner freigesetzt werden, einen weiteren, vermutlich affinitätssteigernden Effekt aufweisen. Die Vorteile eines solchen *Mergings* von Bindungskomponenten wurde bereits von FESIK *et. al.* mithilfe von NMR nachgewiesen werden.^[7] Ausgehend von Fragmenten konnte ein solches *Merging* ebenfalls bereits für Faktor Xa sowohl für die Metalloproteinase 12 erfolgreich angewendet werden.^{[8][9]} Somit erscheint das angestrebte Konzept dieses Projektes erfolgsversprechend

II Kenntnisstand

1. Proteinkinasen

1.1 Allgemeines

Proteinkinasen gehören zur Familie der Transferasen. Ihre konservierte Funktion ist die Übertragung einer γ -Phosphatgruppe von Adenosinatriphosphat (ATP) auf die Seitenkette eines Serins, Threonins oder Tyrosins, das in einem peptidischen Substrat oder einem Protein vorliegt, und kann zur Aktivierung oder zur Inaktivierung des Substrates führen.^{[3][4]} Diese Phosphorylierung löst weitere Effekte in den Zellen aus und ist somit eine Möglichkeit der Signalweiterleitung. Proteinkinasen sind somit oftmals an Signalkaskaden beteiligt.^{[1][3]} Ihre Gegenspieler sind die Protein-Phosphatasen, die durch Proteinkinasen eingeführte Phosphate wieder abspalten.^[4] Das Gleichgewicht zwischen der Aktivität von Proteinkinasen und Protein-Phosphatasen kann in der Regulation von Stoffwechselprozessen von entscheidender Bedeutung sein. Ein Beispiel für die Signalweiterleitung durch Proteinkinasen ist in Abbildung 1 dargestellt.

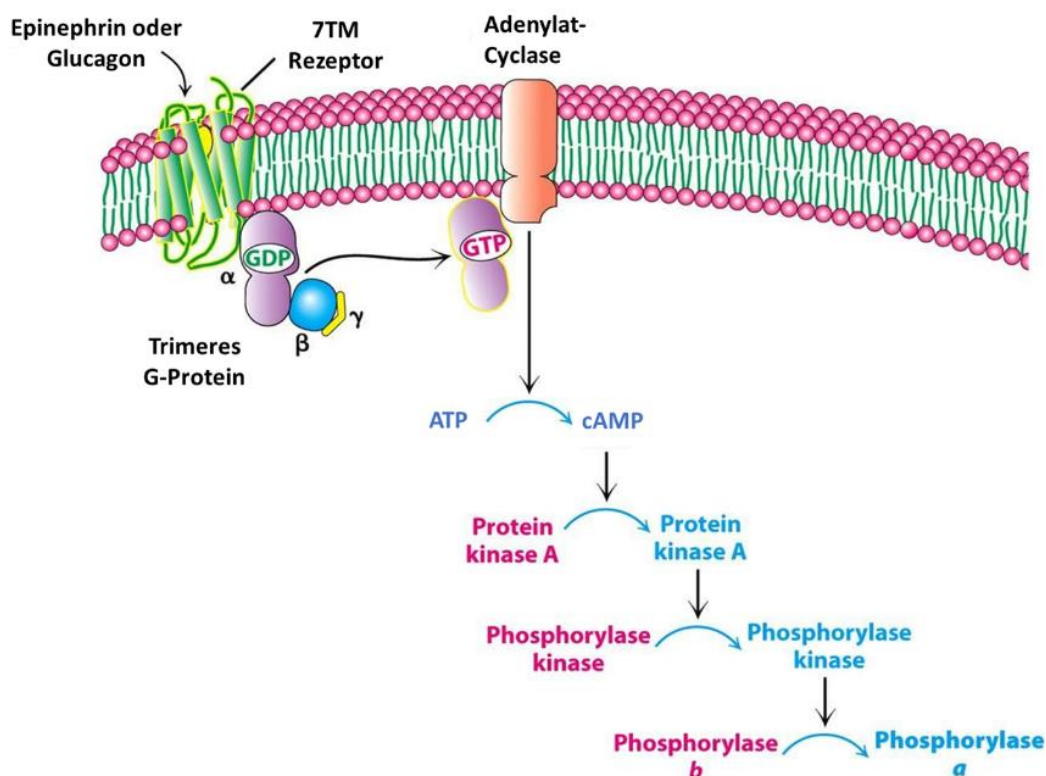


Abbildung 1: Schematische Signalweiterleitung in der Glucagon-Regulation durch die Proteinkinase A (PKA) und die Phosphorylase-Kinase.^[10]

1.2 Arten von Proteinkinasen

Die Familie der Proteinkinasen wird entsprechend ihrer Sequenzähnlichkeit und ihrer Funktion in neun verschiedene Klassen unterteilt, die in Tabelle 1 zu finden sind. Die Einteilung ist oftmals auf die zuerst entdeckten Vertreter der jeweiligen Klassen bezogen.

Tabelle 1: Einteilung der Familie der Proteinkinasen.^{[1][11][12]}

Klasse	Einteilungskriterium
AGC-Kinasen	Ähnlichkeit zu Proteinkinasen A, G und C
CMGC-Kinasen	Ähnlichkeit zu CDK-, MAPK-, GSK3- und CLK- Kinasen
CAMK-Kinasen	Ähnlichkeit zu Calcium-regulierter Kinase (CAMK)
CK1-Kinasen	Ähnlichkeit zu Casein Kinase 1 (CD1)
STE-Kinasen	Homologie zu STE7, STE11 und STE20 Genen aus Hefe
TK-Kinasen	Kinasen, die ausschließlich Tyrosine phosphorylieren
TKL-Kinasen	Ähnlichkeit zu TK-Kinasen, jedoch keine Selektivität für Tyrosin-Phosphorylierung
RGC-Kinasen	Vorliegen einer aktiven Guanylat-Cyclase-Domäne
PKL-Kinasen	Vorliegen einer Protein-Kinase-ähnlichen (PKL)-Faltung und eines katalytischen Mechanismus, der den eukaryotischen Proteinkinasen ähnelt; jedoch ohne große Sequenz-Ähnlichkeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Proteinkinase A (PKA), einem Vertreter der AGC-Kinasefamilie gearbeitet.

1.3 Konservierte Strukturelemente der AGC-Kinasen

Wie bereits in vorigen Abschnitten erwähnt, weisen Proteinkinasen hochkonservierte Strukturelemente in ihren katalytischen Einheiten auf.^{[1][2]} Der allgemeine Aufbau einer solchen katalytischen Einheit ist in Abbildung 2 beispielhaft gezeigt.

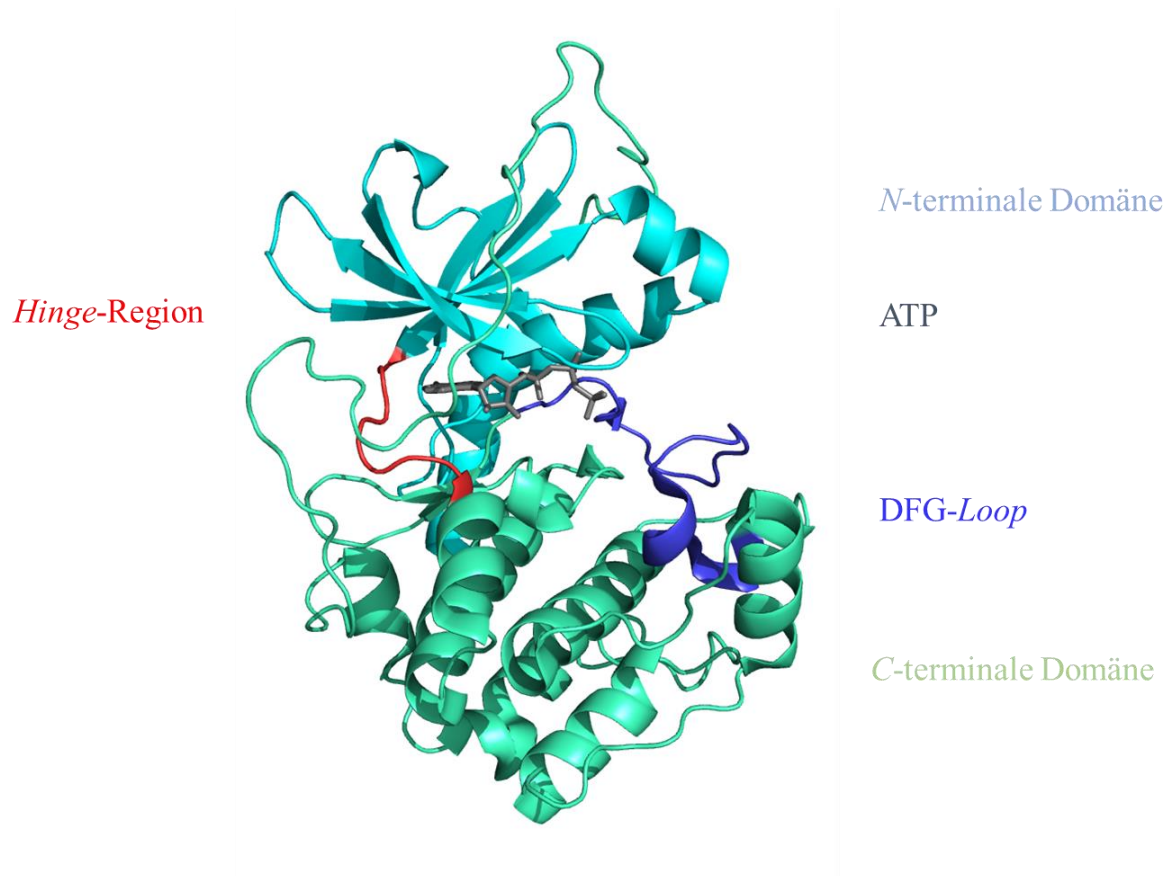


Abbildung 2: Allgemeiner Aufbau der katalytischen Einheiten von Proteinkinasen am Beispiel der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PDB-Code 3FJQ). Das Protein ist in der Cartoon-Darstellung, während das gebundene ATP (grau) in der Stick-Darstellung gezeigt ist. Farblich hervorgehoben sind die *N*-terminale Domäne (cyan), die *C*-terminale Domäne (aquamarin), der *DFG-Loop* (blau) und die *hinge*-Region (rot).

Die katalytische Einheit besteht aus in zwei großen Domänen: Die *N*-terminale (in Abbildung 2 türkis) und die *C*-terminale-Domäne (in Abbildung 2 grün). Diese Domänen werden durch die so genannte Scharnierregion (*hinge*, in Abbildung 2 rot) miteinander verknüpft, die Erkennungssequenzen für ATP enthält.

Die kleinere *N*-terminale Domäne besteht aus einem fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblatt und vereinzelt α -helicalen Abschnitten, während die größere *C*-terminale Domäne fast vollständig aus α -Helices besteht.^[13] In der *C*-terminalen Domäne befindet sich der, in der Proteinkinase-Familie hochkonservierte, so genannte *DFG-Loop* (in Abbildung 2 blau), der essentiell für die Aktivität der Proteinkinasen ist. Proteinkinasen können in einer aktiven und inaktiven Form vorliegen. Beim Übergang der inaktiven in die aktive Form müssen Konformations-Änderungen auftreten, um die in der Substratbindung und katalytischen Aktivität beteiligten Gruppen korrekt zu positionieren. Dabei nimmt der *DFG-Loop* eine besondere Rolle ein. In der inaktiven Form liegt der *DFG-Loop* in der so genannten *DFG-Out*-Position vor, so dass er die ATP-Bindestelle blockiert, während er in der aktiven Form die *DFG-In*-Position annimmt und die Bindestelle freilegt.^{[13][14][15]} Die Änderung dieser Konformation tritt ein, wenn ein Threonins, das innerhalb des *DFG-Loops* liegt, phosphoryliert wird.^[14] Diese Phosphorylierung kann autokatalytisch vollzogen werden, kann jedoch auch abhängig von weiteren Proteinkinasen sein.^[14] Der Vergleich der Konformationen ist in Abbildung 3 gezeigt.

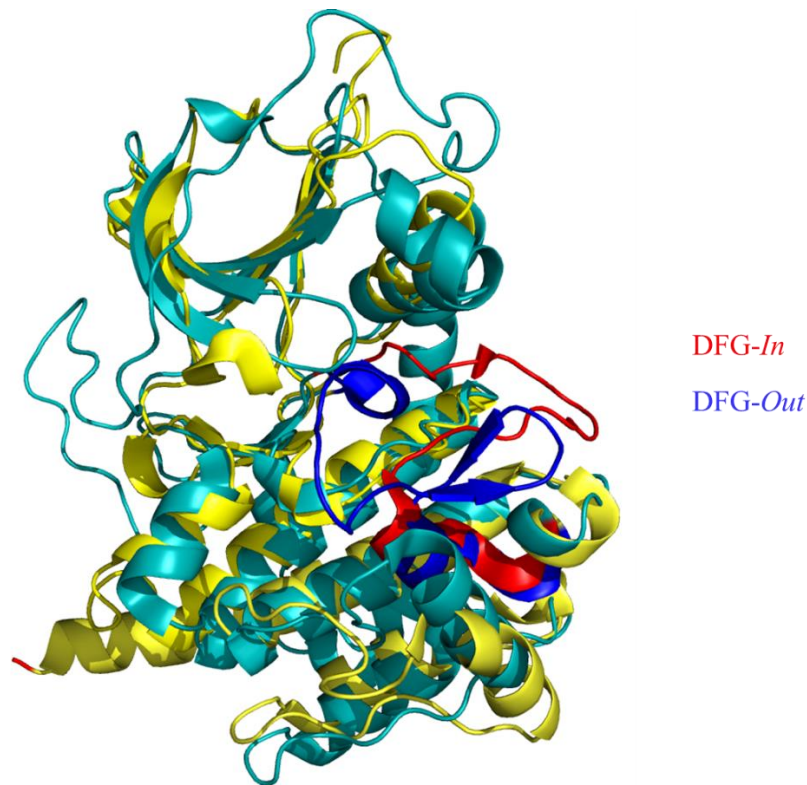


Abbildung 3: Überlagerung der Cartoon-Darstellung der aktiven (*DFG-In*, rot) und der inaktiven (*DFG-Out*, blau) Form von Proteinkinasen am Beispiel der aktiven Form der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PDB-Code 3FJQ (aquamarin)) und der inaktiven Form der katalytischen Domäne der ABL1 Proteinkinase (PDB-Code 3KFA (gelb)).

Der DFG-Loop, der mit den Aminosäuren Aspartat (D), Phenylalanin (F) und Glycin (G) beginnt, endet im so genannten APE-Motiv, das aus den Aminosäuren Alanin (A), Prolin (P) und Glutamat (E) besteht. Die Gesamtheit des DFG-Loops bis zum APE-Motiv wird auch als Aktivierungs-Loop bezeichnet. In der Literatur wird jedoch meist der Ausdruck DFG-Loop als Synonym für den Aktivierungs-Loop gewählt.^{[14][16]}

1.4 Mechanismus der Phosphorylierung

Zur Phosphorylierung durch Proteinkinasen müssen zuerst das peptidische Substrat sowie ATP als Phosphatdonor an die Proteinkinase gebunden werden. Dabei wird das Adenin stets analog zu Abbildung 4 gezeigt am Rückgrat der *hinge*-Region gebunden, die einen Teil der hochkonservierten ATP-Bindestelle darstellt. Die Peptidbindestelle ist dagegen deutlich variabler.

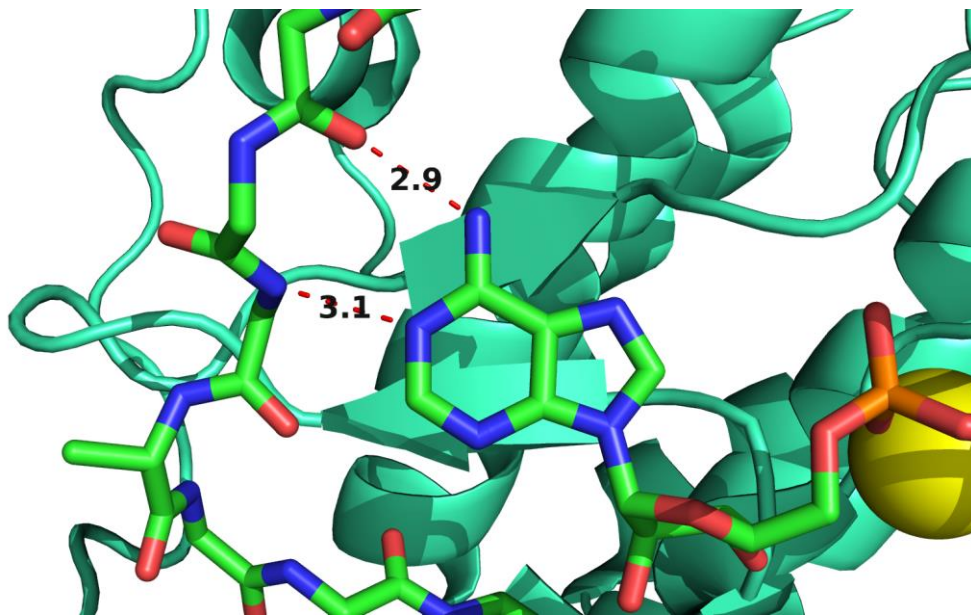


Abbildung 4: Bindung des Adenins von ATP an das Rückgrat der *hinge*-Region in der PKA (PDB-Code 3FJQ). Das Protein ohne die *hinge*-Region (aquamarin) ist in der Cartoon-Darstellung gezeigt, die *hinge*-Region sowie ATP sind in der Stick-Darstellung gezeigt und entsprechend ihrer Atome gefärbt. Kohlenstoff sind grün, Sauerstoffe rot, Stickstoffe blau und Phosphor-Atome orange eingefärbt. Die gestrichelte rote Linie mit schwarzer Beschriftung zeigt die Länge der Wasserstoffbrückenbindung zwischen den ATP-Stickstoffen und dem Rückgrat der *hinge*-Region.

Nach Bindung des Phosphatdonors (ATP) und des Phosphatakzeptors (peptidisches Substrat), wird die Phosphatübertragung analog zu Abbildung 5 durchgeführt. Dabei koordinieren die β - und γ -Phosphatgruppen über ein Magnesiumkation an ein Aspartat des DFG-Loops. Ein zweites Magnesiumkation hilft die Phosphate korrekt auszurichten.

Die Phosphorylierung selbst findet statt, indem die zu phosphorylierende Aminosäure, in diesem Fall Serin des peptidischen Substrates, einen nukleophilen Angriff auf die γ -Phosphatgruppe ausübt und diese unter Ausbildung einer trigonal-bipyramidalen Zwischenstufe am Phosphor übertragen wird. Das bei der Reaktion von der Hydroxygruppe des Substrates abgespaltene Proton wird dabei von einem weiteren Aspartat des Proteins übernommen.

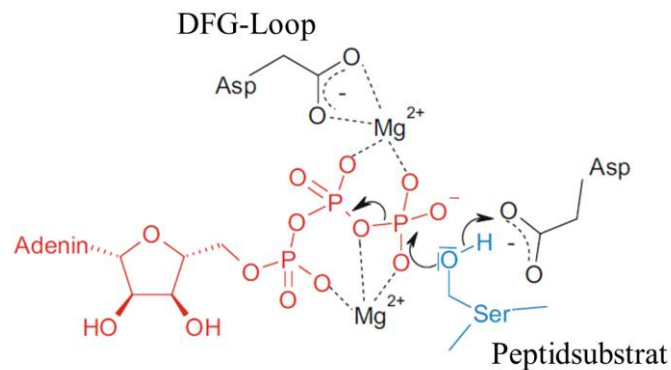


Abbildung 5: Allgemeiner Katalysemechanismus der Proteinkinasen. ATP wird mittels Magnesiumionen an ein Aspartat des DFG-Loops koordiniert. Ein zweites Magnesiumion sorgt für die korrekte Geometrie der Phosphatgruppen. Die Hydroxygruppe des Peptidsubstrates kann nun nukleophil an das γ -Phosphat von ATP angreifen. Das bei dieser Phosphatübertragung freiwerdende Proton wird an ein weiteres Aspartat des Proteins abgegeben.^[13]

Nach der Phosphatübertragung werden das peptidische Substrat sowie das nun vorliegende ADP abgespalten.

1.5 Vorkommen im Körper

Im menschlichen Genom sind mehr als 500 verschiedene Proteinkinasen kodiert. Dies entspricht etwa 2 % des gesamten Genoms.^[1] Einige Proteinkinasen sind ubiquitär, also in jeder einzelnen Zelle vorhanden, während andere Proteinkinasen nur in bestimmten Geweben vorliegen. Ebenfalls sind viele Kinasen innerhalb der gesamten Klasse der Säugetiere konserviert, sodass sie nicht nur im menschlichen Körper, sondern auch in bei weniger hoch entwickelten Tieren vorliegen. Nur in Pflanzen sind viele Kinasen wie beispielsweise die cAMP-abhängige Proteinkinase A im Vergleich zu den höher entwickelten Organismen nicht konserviert. In jedem Gewebe sind die Proteinkinasen an der Signaltransduktion beteiligt und können im Falle einer Fehlregulation der Entstehung vieler Krankheiten beteiligt sein.^{[1][2][17]}

1.6 Durch Proteinkinasen beeinflusste Krankheiten

Die Entstehung vieler Krankheiten wird durch fehlregulierte Proteinkinasen verursacht, weshalb Proteinkinasen ein attraktives Ziel für die Wirkstoffentwicklung darstellen. Vor allem die Entstehung vieler Arten von Krebs, wie beispielsweise die chronische myeloische Leukämie, wird durch fehlerhafte Proteinkinasen beeinflusst.^[3] Die erste entdeckte Proteinkinase, deren Gen als Protoonkogen wirksam werden kann, war die Tyrosinkinase Src. Eine Mutation des Src-Genes durch den Aviären Leukosevirus (ALV) führt in Hühnern zu einer Entwicklung von B-Zell-Leukämie.^{[18][19]} Mittlerweile wurden viele weitere fehlregulierte Kinasen gefunden, deren Gene Krebszellen überexprimiert werden, wie beispielsweise PDK1, oder die als Onkogene dienen, wie MAST-Kinasen.^[20] Viele andere Proteinkrankheiten (Diabetes, Autoimmunerkrankungen, etc.) werden ebenfalls maßgeblich durch Kinasen beeinflusst. So ist beispielsweise AKT maßgeblich an der Entstehung von Diabetes beteiligt, da es in die Regulation der physiologischen Vorgänge der Insulinbildung und Freisetzung involviert ist.^[20]

1.7 Bekannte Kinaseinhibitoren

Für viele Proteinkinasen sind Inhibitoren mit hoher Affinität bekannt. Diese zeigen jedoch oftmals eine unzureichende Selektivität und inhibieren parallel viele andere Kinasen. Allgemein teilen sich diese Inhibitoren in drei Kategorien: Inhibitoren die die ATP-Bindestelle an der *hinge*-Region blockieren und somit kompetitiv gegen ATP sind, Inhibitoren, die die Peptid-Substrat-Bindestelle blockieren, und allosterische Binder, die weder die Peptid- noch die ATP-Bindestelle besetzen sondern über einen alternativen Mechanismus den strukturellen Aufbau und somit die Affinität der Proteinkinase gegen seine Substratmoleküle regulieren. Die meisten bekannten Inhibitoren gehören zur Kategorie der *hinge*-Binder.^{[5][13]}

1.7.1 Hinge-Binder

Viele verschiedene Inhibitoren sind bekannt, die kompetitiv zu ATP in der *hinge*-Region von Proteinkinasen binden. Der erste dieser Inhibitoren, der als Arzneistoff zugelassen wurde, ist Fasudil (Abbildung 6).^[5]

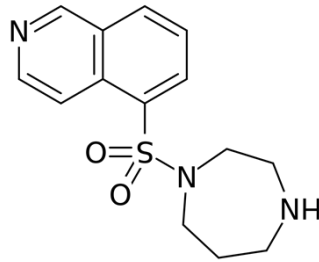


Abbildung 6: Strukturformel von Fasudil.

Seit 1995 wurde es zur Behandlung zerebraler Vasospasmen in Japan zugelassen und, obwohl es keine größeren Nebenwirkungen aufweist, ist der Wirkmechanismus noch nicht aufgeklärt. Bekannt ist, dass Fasudil mehrere Proteinkinasen wie beispielsweise die ROCK hemmt, jedoch keine Selektivität für eine bestimmte Proteinkinase aufweist. Allerdings ist nicht bekannt, welche inhibierte Proteinkinase zum gewünschten therapeutischen Effekt führt oder ob ein Wirkmechanismus vorliegt, der nicht auf der Hemmung von Proteinkinasen basiert.^[5]

Ein weiterer, sehr wichtiger der *hinge*-Binder ist Staurosporin (Abbildung 7), das bereits als antifungales Mittel benutzt wurde, bevor entdeckt wurde, dass es als nanomolarer Inhibitor für die PKC wirkt.^[5]

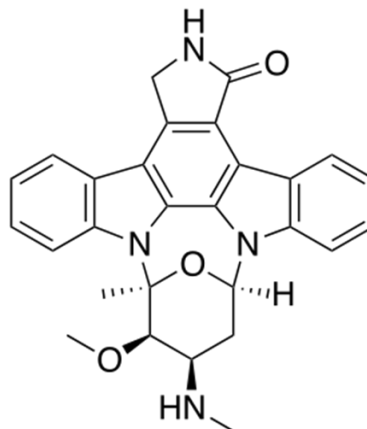


Abbildung 7: Strukturformel von Staurosporin.

Der Befund, dass Staurosporin ein potenter Proteinkinaseninhibitor aus einem Mikroorganismus ist, führte dazu, dass Pharmaunternehmen begannen, vermehrt Inhibitoren für Proteinkinasen zu entwickeln. Viele dieser Inhibitoren wiesen jedoch fehlende Selektivität für einzelne Kinasen auf und scheiterten in klinischen Studien.^[5]

Auch heutzutage scheitern trotz hohem Forschungsaufwand der Pharmaunternehmen noch viele potentielle Inhibitoren an den selben Problemen.

Der größte klinische Erfolg im Bereich der Proteinkinaseinhibitoren war Imatinib (Handelsname Glivec, Abbildung 8).

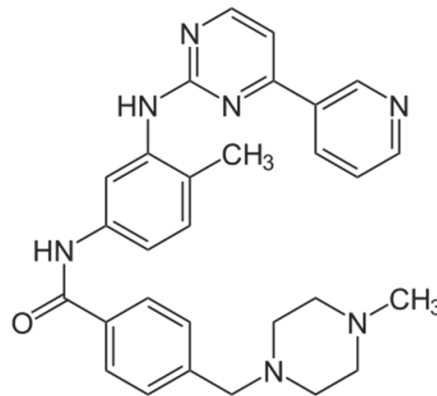


Abbildung 8: Strukturformel von Imatinib.

Imatinib inhibiert eine mutierte Form der ABL-Kinase, die in beinahe allen Fällen der chronischen myeloischen Leukämie auftritt. Da in gesunden Zellen diese Mutation nicht vorhanden ist, konnte eine hohe Selektivität in Verbindung mit einer hohen Effizienz erreicht werden und Imatinib wurde bald als Arzneimittel zugelassen.^{[3][5][13]}

Viele weitere Inhibitoren für die *hinge*-Region sind bis heute bekannt, jedoch konnte nur ein Bruchteil der gefundenen Leitstrukturen zu einem erfolgreichen Arzneimittel entwickelt werden. Darüber hinaus wurden für bereits zugelassene und in der Therapie bewährte Arzneimittel wie Imatinib Resistenzbildungen beobachtet, so dass immer wieder neue Strategien zur Modulation von Proteinkinasen erforderlich sind.^{[3][5][13]}

1.7.2 Peptidische Inhibitoren

Obwohl die Verwendung von peptidischen Inhibitoren ein vielversprechendes Konzept zum Erreichen höherer Selektivität ist, konnte bisher noch kein peptidischer Inhibitor in klinischen Studien getestet werden.^[5] Inhibitoren, die sich gegen die Peptidsubstrat-Bindestelle richten, besitzen den Vorteil, dass sie an eine Region binden, die aufgrund der sequenziellen Vielfalt der Substrate eine viel größere strukturelle Variation im Bindebereich aufweisen.

Für bestimmte Proteinkinasen wie beispielsweise die cAMP-abhängige Proteinkinase A sind endogene Peptide als Liganden bekannt. Im Rahmen dieser Dissertation ist hier vor allen Dingen der *Protein Kinase Inhibitor* (PKI) zu nennen, ein 20 Aminosäuren langes Peptid, dessen Bindung an die Proteinkinase A gut dokumentiert ist. Seine inhibitorische Wirkung entfaltet das Peptid durch die hohe Sequenzidentität zum natürlichen Substrat. Lediglich das Serin, das im nativen Substrat als Phosphatakzeptor dient, wurde im PKI zu Alanin abgewandelt, so dass eine Phosphatübertragung nicht länger möglich ist.^[21] Die Sequenzen von nativem Substrat und PKI sind im Anhang in Abbildung 94 zu finden.

1.8 Affinitätsbestimmung an Kinasen durch Phosphorylierungsassays

Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten von potentiellen Kinaseinhibitoren wurden vorwiegend Phosphorylierungsassays verwendet. In diesen Assays wird der Einfluss von potentiellen Liganden auf die Phosphorylierung eines peptidischen Substrates durch die Kinase untersucht, indem katalytische Einheiten der Kinasen mit radioaktiv markiertem ATP und einer definierten Menge peptidischem Substrat inkubiert werden. Nach einer bestimmten Zeit wird diese Lösung mit einem *Quencher* versetzt, der zum Stopp der Phosphorylierungsreaktion führt. Eine Probe des Reaktionsgemischs wird entnommen, die peptidischen Substrate aus der Probe isoliert und der Grad der Phosphorylierung mittels der Detektion des radioaktiven Phosphates, das auf das Substrat übertragen wurde, gemessen.

Durch Wiederholung der Messung mit Zusatz von verschiedenen Ligand-Konzentrationen wird der Einfluss auf die Phosphorylierung in Abhängigkeit der Konzentration bestimmt und anschließend mittels einer LINEWEAVER-BURK-Auftragung und der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung (siehe Abbildung 9) in eine Affinität in Form eines K_I umgerechnet.^{[21][22][23]}

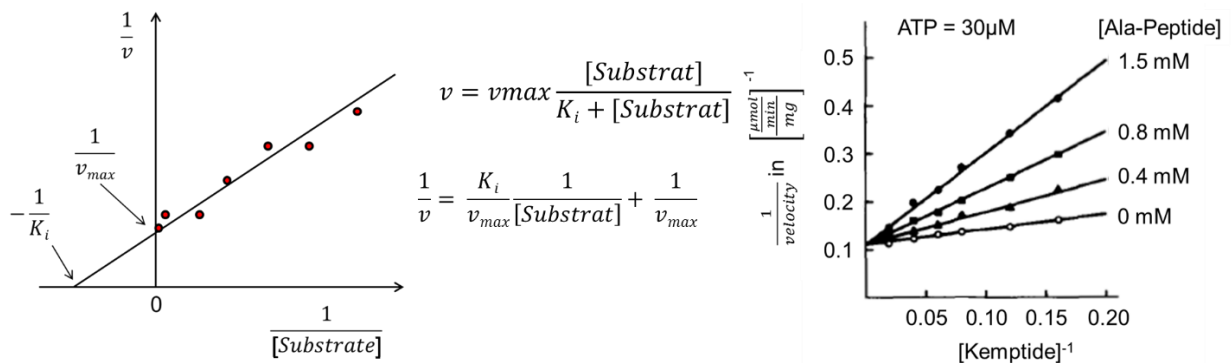


Abbildung 9: Schematische LINEWEAVER-BURKE-Auftragung (links), MICHAELIS-MENTENS-Gleichung (Mitte) und LINEWEAVER-BURKE-Auftragung eines Phosphorylierungsassays an der Proteinkinase A mit Kemptide als peptidischem Substrat und einem modifizierten Peptid als Ligand.^[23]

1.9 cAMP-abhängige Proteinkinase A

1.9.1 Allgemeines

Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (kurz: PKA) wurde 1968 von WALSH *et. al* zum ersten Mal aufgereinigt und charakterisiert.^[24] Sie war die zweite, jemals charakterisierte Proteinkinase und die erste Proteinkinase, deren Struktur durch Röntgenbeugung aufgeklärt werden konnte.^{[2][25]} Aufgrund ihrer geringen Komplexität und reduzierten Größe, sowie ihres simplen Regulationsmechanismus (siehe Abschnitt 1.9.3. Struktur und Regulationsmechanismus) wird die PKA heute bevorzugt als Modellproteinkinase verwendet. Ebenfalls handelt es sich bei der PKA um eine der wenigen Proteinkinasen, die rekombinant in *E.coli* produziert und mit guter Ausbeute in einer aktiven Form aufgereinigt werden können.^[2]

1.9.3 Struktur und Regulationsmechanismus

Die cAMP-abhängige Proteinkinase A ist sowohl beim Menschen, als auch bei vielen anderen Säugetieren ubiquitär, d.h. in jeder Zelle vorhanden.^[17] Sie besteht aus einer katalytischen (C-Einheit) und einer regulatorischen Untereinheit (R-Einheit). Die R-Einheit weist beim Menschen vier verschiedene Isoformen auf (RI α , RI β , RI α , RI β).

Alle Isoformen weisen eine N-terminale Dimerisierungsdomäne, eine inhibitorische Domäne und zwei C-terminale cAMP-Bindestellen auf. Die inhibitorischen Domänen sind strukturell ähnlich zu den natürlichen peptidischen Substraten der katalytischen Einheit, so dass sie diese inhibieren können.

Neben der inhibitorischen Wirkung auf die katalytische Einheit weisen die R-Einheiten Bindestellen zur Fixierung innerhalb des Zytosols auf, um die Einwanderung in den Zellkern zu verhindern. Verschiedene R-Einheiten werden in verschiedenen Geweben exprimiert und dienen somit als Regulationsmechanismus.^{[20][26]}

In Zellen liegt die PKA als inaktives Holoenzym vor, das aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten gebildet wird (siehe Abbildung 10).

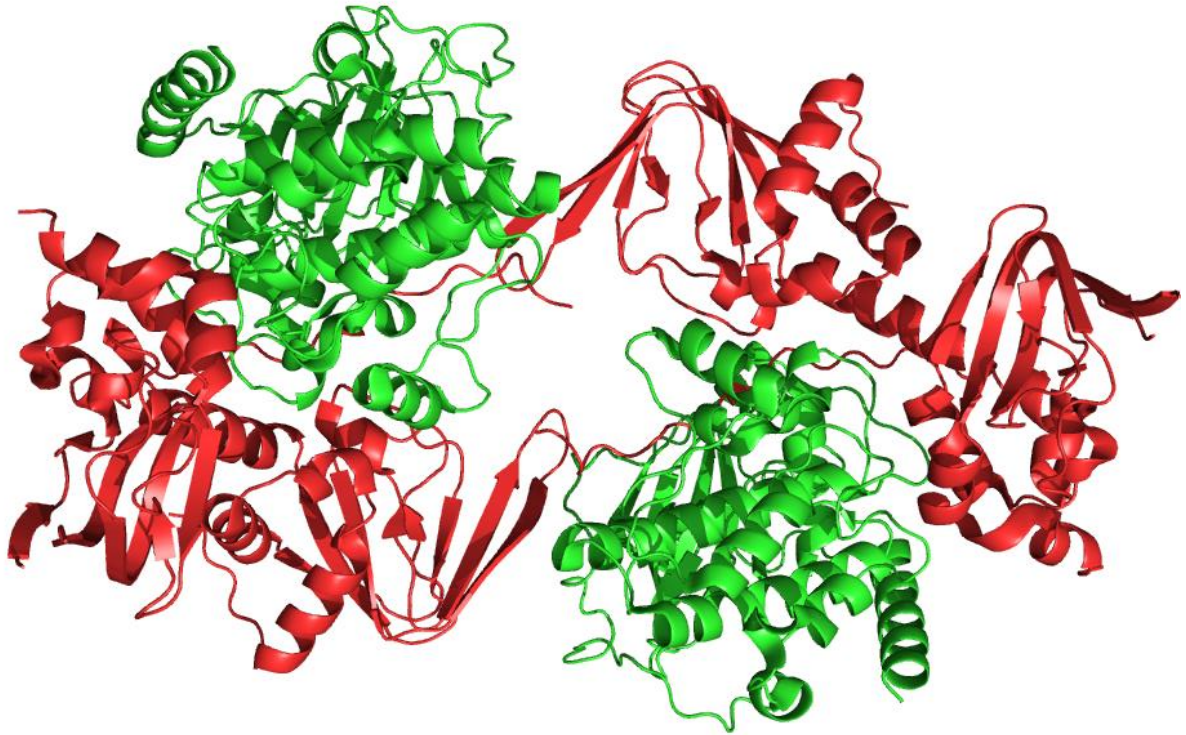


Abbildung 10: Cartoon-Darstellung des inaktiven Tetramers der PKA bestehend aus zwei regulatorischen (rot) und zwei katalytischen (grün) Untereinheiten. (PDB-Code 3TNP)

Die regulatorischen Einheiten inhibieren in diesem Tetramer die katalytischen Einheiten und sorgen für eine Lokalisation im Zytoplasma; im Gegensatz zur freien katalytischen Einheit kann das Holoenzym nicht in den Zellkern einwandern.^{[2][26]} Durch die Bindung von vier Molekülen zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) an die regulatorischen Einheiten dissoziiert das Tetramer und die Proteinkinase kann ihre katalytische Aktivität entfalten.^{[2][10]}

Die katalytische Untereinheit besteht aus 350 Aminosäuren (Sequenz im Anhang in Abbildung 93) und eine Struktur der katalytischen Untereinheit ist in Abbildung 11 gezeigt.

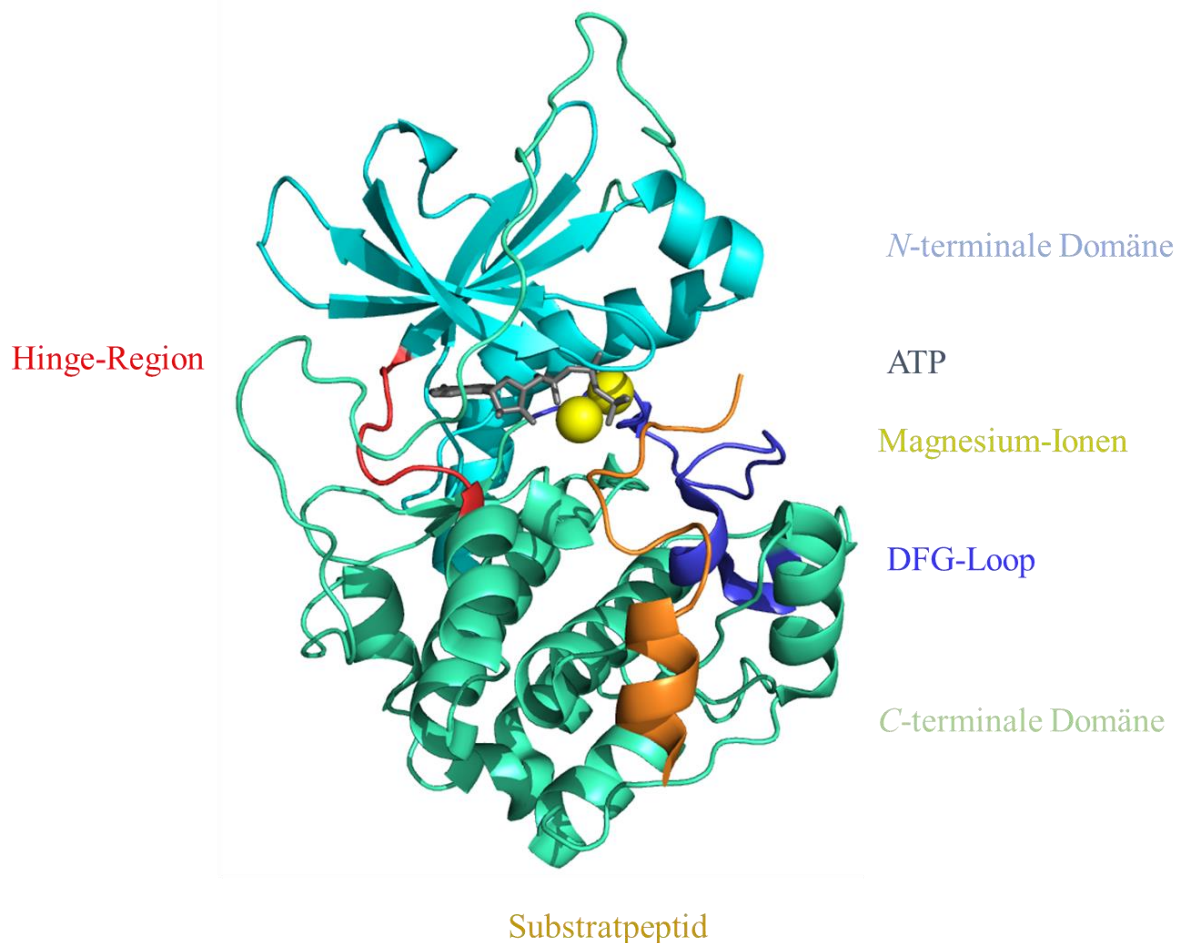


Abbildung 11: Aufbau der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PDB-Code 3FJQ)).

Das Protein ist in der Cartoon-Darstellung gezeigt, während das gebundene ATP (grau) in der Stick-Darstellung gezeigt ist und die gebundenen Magnesium-Ionen (gelb) als Kugeln gezeigt sind. Farblich hervorgehoben sind die *N*-terminale Domäne (türkis), die *C*-terminale Domäne (grün), der *DFG-Loop* (blau) und die *hinge*-Region (rot).

Ebenfalls gezeigt ist ein gebundener peptidischer Inhibitor (orange) in der Cartoon-Darstellung.

Entsprechend der allgemeinen Faltung von Proteinkinasen (siehe Abschnitt 1.3, konservierte Strukturelemente der AGC-Kinasen) weist auch die PKA eine *N*-terminale Domäne auf, die aus einem fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblatt und eine *C*-terminale Domäne, die größtenteils α -Helices umfasst. Die verknüpfende *hinge*-Region besteht aus den Aminosäuren Glu¹²⁰ bis Glu¹²⁷ während die Aktivierungsschleife mit dem *DFG*-Motiv an der Aminosäure Asp¹⁸⁴ beginnt und am *APE*-Motiv mit der Aminosäure Glu²⁰⁴ endet. Die Struktur enthält vier konservierte Phosphorylierungsstellen, die zur Überführung des Proteins in die aktive Form beitragen. Hierbei handelt es sich um Ser¹⁰, Ser¹³⁹, Thr¹⁹⁷ und Ser³³⁷. Diese Aminosäuren liegen in der aktiven Form der PKA stets phosphoryliert vor. Die Phosphorylierung von Thr¹⁹⁷ ist essentiell für die Ausbildung der katalytisch aktiven *DFG-In*-Konformation.

Wie in Abbildung 11 gezeigt binden Substratpeptide oberhalb des DFG-*Loops* und in direkter Nachbarschaft zur ATP-Bindetasche. In der ATP-Bindetasche befinden sich darüber hinaus zwei Magnesium-Ionen, die an der Phosphatübertragung beteiligt sind.^{[14][15][20][23]}

1.9.4 Aufgaben im Körper

Die Proteinkinase A übernimmt im menschlichen Körper viele verschiedene Aufgaben und ist ubiquitär zu finden. Einige Beispiele für die Aufgaben, die die PKA übernimmt, sind die Signalweiterleitung von verschiedenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB und regulatorische Funktionen im Glykogen-Metabolismus.^[20]

2. Assays

2.1 *Thermal-Shift Assay* (TSA)

Die Stabilität von Proteinen wird anhand ihres Schmelzpunktes, also der Temperatur, bei der die Faltung aufgebrochen und das Protein denaturiert wird, gemessen. Diese Stabilität kann durch viele verschiedene Faktoren wie die Konzentration an Salzen, den pH-Wert oder auch die Bindung von Cofaktoren und Liganden beeinflusst werden. In diesem Fall verschiebt sich der Schmelzpunkt des Proteins zu höheren oder niedrigeren Temperaturen. Im *Thermal-Shift Assay* (TSA), auch Thermofluoreszenz-Assay genannt wird die Schmelztemperatur von Proteinen mithilfe eines Fluoreszenz-Farbstoffes bestimmt. Ein solcher Farbstoff, beispielsweise das im Rahmen dieser Arbeit verwendete SYPRO-Orange, kann sich an hydrophobe Aminosäuren anlagern, was zu einer erhöhten Fluoreszenz des Farbstoffs führt. kann. In einem korrekt gefalteten Protein liegen hydrophobe Aminosäuren meistens im Protein-Inneren, abgeschirmt vom Lösungsmittel vor, da polare-unpolare-Wechselwirkungen zwischen Wasser und den Seitenketten der unpolaren Aminosäuren energetisch ungünstig sind und zu kaum wasserlöslichen Proteinen führen würde. Bei der Entfaltung des Proteins werden allerdings auch diese Aminosäuren zu dem Lösungsmittel exponiert, sodass sich der hydrophobe Farbstoff anlagern kann und ein Anstieg der Fluoreszenz detektiert werden kann.^{[27][28]} Somit ergibt sich eine Schmelzkurve wie in Abbildung 12 gezeigt. Der Wendepunkt der Kurve entspricht dem Schmelzpunkt des Proteins.

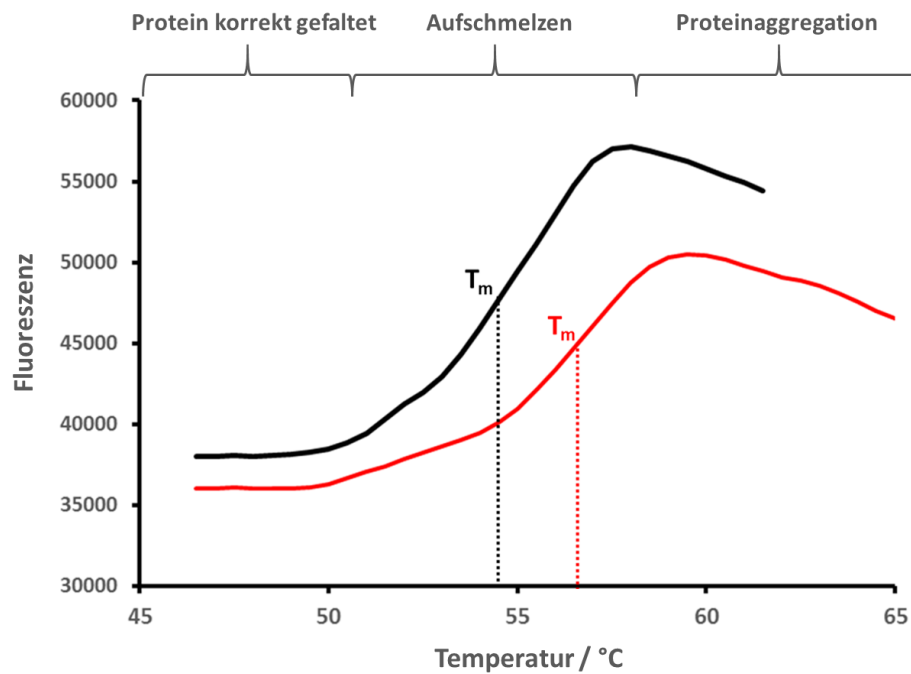


Abbildung 12: Schmelzkurven im *Thermal-Shift*-Assay. T_m bezeichnet den Wendepunkt der Kurve und somit den Schmelzpunkt des Proteins. Aufgetragen sind hierbei die gemessene Fluoreszenz in der Lösung gegen die Temperatur.

Angemerkt sind die verschiedenen Bereiche der Kurve, in denen das Protein korrekt gefaltet vorliegt, mit dem Schmelzen beginnt und an dem das Protein vollständig geschmolzen vorliegt und aggregiert. Die Fluoreszenz entsteht durch die Zugabe des fluoreszenzten Farbstoffs SYPRO-Orange, der an hydrophobe Aminosäuren bindet.

Zur Bestimmung des Wendepunktes und somit des Schmelzpunktes des Proteins wird die erste Ableitung der Schmelzkurve gebildet und gegen die Temperatur aufgetragen (siehe Abbildung 13). Das Minimum der ersten Ableitung der Schmelzkurve, das mit Tabellenprogrammen wie Microsoft Excel bestimmt werden kann, entspricht dem Wendepunkt der Kurve

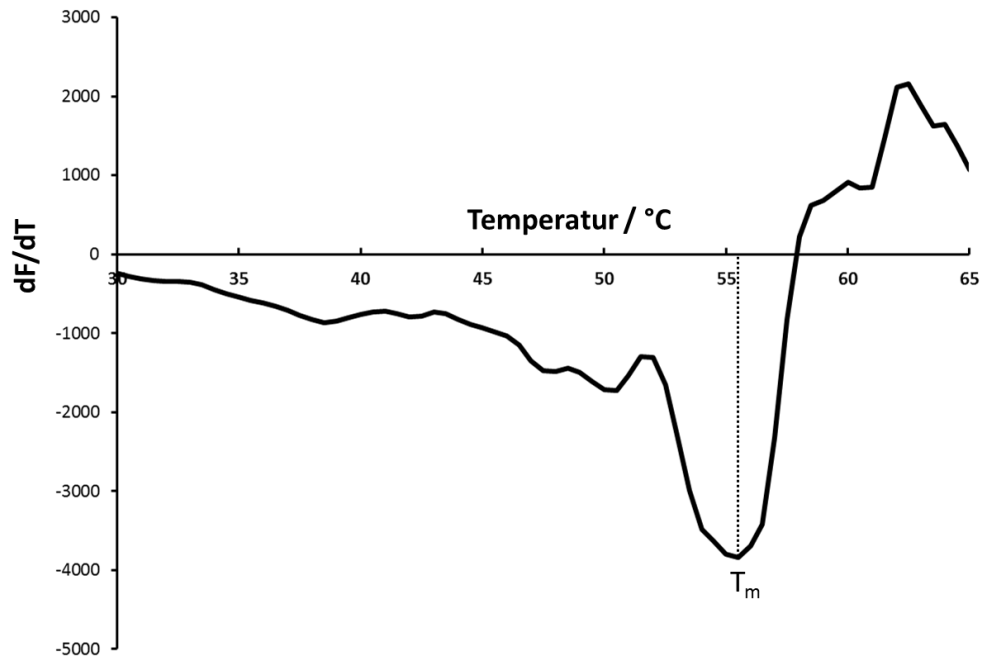


Abbildung 13: Auftragung der ersten Ableitung einer Schmelzkurve gegen die Temperatur. Das Minimum der Kurve entspricht dem Schmelzpunkt des Proteins, das in der Schmelzkurve vermessen wurde.

2.2 Mikroskalierte Thermophorese (MST)

Der mikroskalierte Thermophorese-Assay (MST-Assay) ist eine Möglichkeit, die Diffusion von Molekülen entlang eines Temperaturgradienten zu verfolgen. Diese Diffusion ist abhängig von verschiedenen Parametern wie beispielsweise dem Molekulargewicht der Moleküle oder den Solvatationseigenschaften. Wird die Diffusion eines Biomoleküls wie beispielsweise eines Peptides oder eines Proteins betrachtet, so ändern sich die Diffusionseigenschaften bei Bindung eines Liganden oder eines weiteren Proteins. Diese Änderung kann in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration gemessen werden, um die Bindungsaffinität zu ermitteln.^{[29][30]}

Zur Detektion der beobachteten Moleküle müssen diese zuerst mit einer fluorogenen Gruppe versehen sein. Bei Proteinen kann eine solche Gruppe mithilfe eines Farbstoffes (Alexa Fluor 647) eingeführt werden, der kovalent an ein Lysin auf der Proteinoberfläche bindet. Anschließend wird die zu untersuchende Lösung in eine Kapillare gefüllt und mit einem IR-Laser bestrahlt, während die Fluoreszenz gemessen wird. Durch den IR-Laser entsteht lokal ein geringer Temperaturgradient, sodass das untersuchte Protein entlang des Gradienten diffundiert. Nach dem Abschalten des Lasers liegt der Gradient nicht länger vor und die Diffusion findet in die umgekehrte Richtung statt.

Diese als Thermophorese bezeichnete induzierte Molekülbewegung lässt sich, wie in Abbildung 14 gezeigt, mittels der Fluoreszenzmarkierung in der Lösung nachweisen.^{[29][30]}

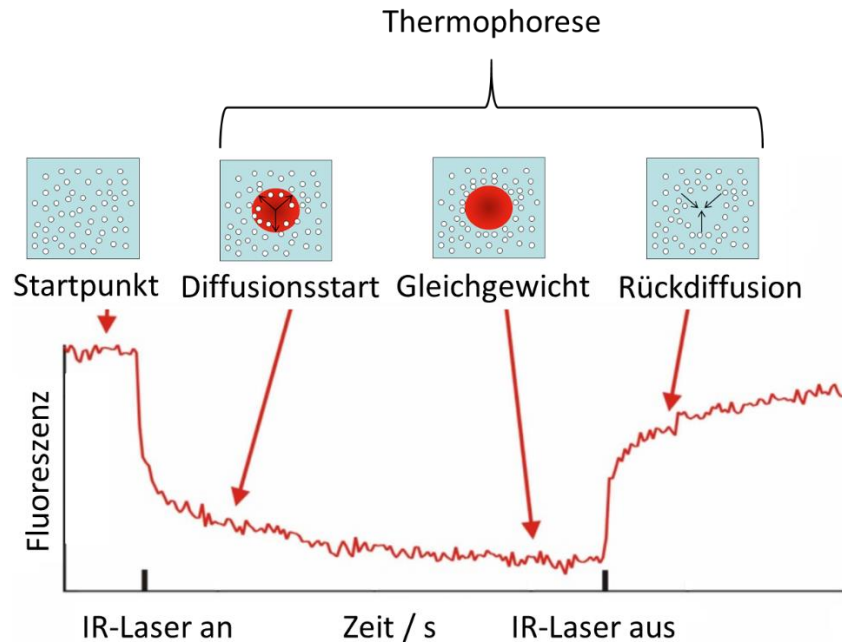


Abbildung 14: Verlauf einer Thermophoresekurve. Aufgezeigt ist die Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zeit. In den blauen Kästchen ist die Bewegung der einzelnen Moleküle in der Lösung gezeigt. Der rote Punkt zeigt die Einstrahlflche des IR-Lasers. Bei den auf der Achse markierten Zeitpunkten wurde der IR-Laser an- oder ausgeschaltet und somit ein lokaler Temperaturgradient erzeugt.

Wird die Messung mit unterschiedlichen Ligand-Konzentrationen wiederholt, so wird die Diffusion in dem Maße wie der Protein-Ligand-Komplex gebildet wird, verändert, wodurch die Kurven gegeneinander verschoben werden (siehe Abbildung 15). Anhand dieser Verschiebung kann eine Bindungskurve berechnet werden (siehe Abbildung 15).

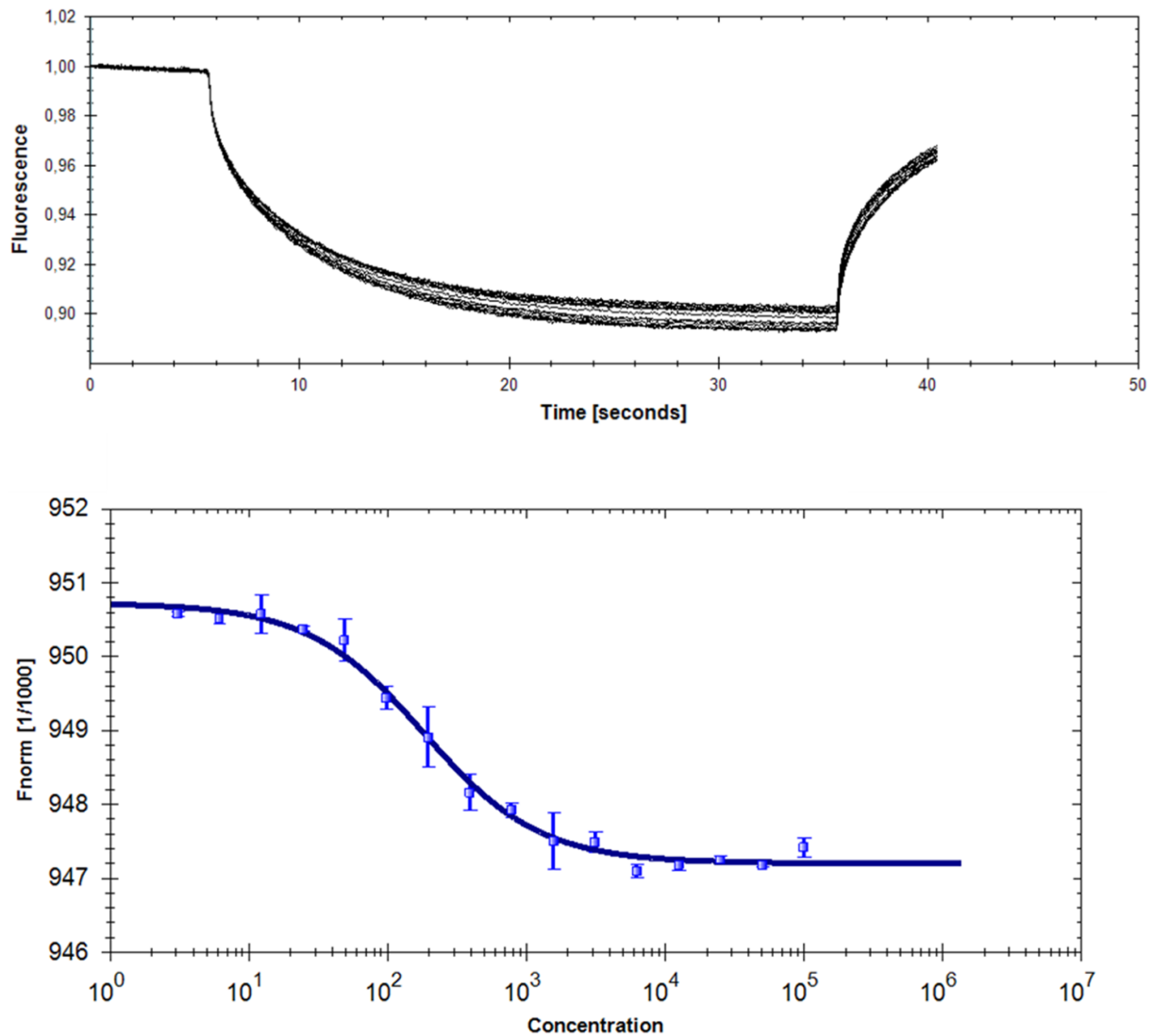


Abbildung 15: Durch Ligandenbindung verschobene MST-Kurven (oben) und somit erhaltene Bindungskurve (unten). Aufgetragen in der MST-Kurve (oben) ist die Fluoreszenz der Lösung gegen die Zeit bei der Messung der Thermophorese. Aufgetragen in der Bindungskurve (unten) ist die normierte Fluoreszenz der Lösung gegen die Konzentration des Liganden. Die Trendkurve (unten, blau) zeigt die vom verwendeten Auswertungsprogramm berechnete Bindungskurve, die eine Affinitätsbestimmung des verwendeten Liganden erlaubt.

III Aufgabenstellung und Beiträge der Kooperationspartner

Im Rahmen dieser Arbeit sollten innerhalb eines Kooperationsprojektes mit den Arbeitsgruppen GEYER und DEHNEN aus Marburg und SCHREINER aus Gießen, nach Maßgabe des LOEWE-SynChemBio-Projektes, mehrere Konzepte zur Entwicklung neuer selektiver peptidischer Inhibitoren für Proteinkinasen entwickelt und mithilfe von Bindungsassays, Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse verifiziert werden.

Die Arbeitsgruppe DEHNEN versuchte hierbei Chalkogenid-Cluster zu entwickeln, die innerhalb der ATP-Bindetasche von Proteinkinasen binden können. Durch die Möglichkeit der weiteren Funktionalisierung sind diese Cluster ein guter Ausgangspunkt für die Einführung vieler neuer diverser Eigenschaften. Bis zum Ende dieser Arbeit konnten jedoch leider keine Cluster erhalten werden, die in Bindungsassays oder kristallographischer Strukturaufklärung getestet werden konnten.

Die Arbeitsgruppe SCHREINER entwickelte Adamantyl- und Diamantoid-Cluster, die zur späteren Funktionalisierung mit den in der Arbeitsgruppe DEHNEN entwickelten Chalkogenid-Clustern geeignet waren. In einem weiteren Ansatz gelang es ihnen, sowohl α - als auch β - und γ -Aminosäuren mit Adamantyl- und Diamantoid-Clustern zu synthetisieren.^[31] Die auf diesem Weg erhaltenen Aminosäuren sind in Abbildung 16 gezeigt.

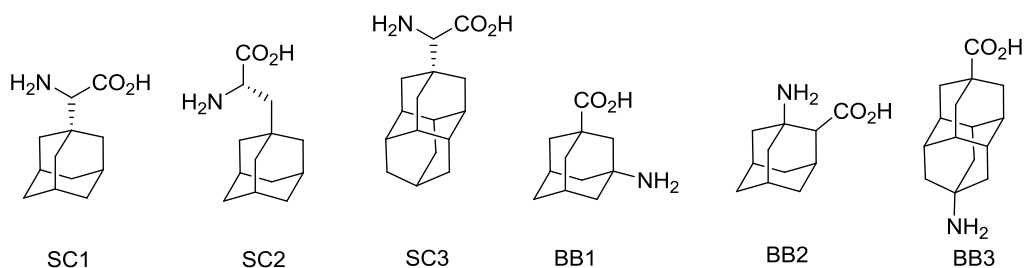


Abbildung 16: Im Arbeitskreis SCHREINER synthetisierte neue Aminosäuren mit Adamantyl- und Diamantoid-Clustern. Der intern verwendete Name der Aminosäuren, wie beispielsweise BB1, sind unterhalb der jeweils zugehörigen Struktur gegeben.^[31]

Von den Aminosäuren SC1, SC2 und SC3 wurden sowohl die *S*- als auch die *R*-konfigurierten Enantiomere synthetisiert.^[31]

Diese neuartigen Aminosäuren sollten anhand von Molekulardynamik-Simulationen (MD-Simulationen) in den als PKI bezeichneten, literaturbeschriebenen endogenen peptidischen Inhibitor für die PKA eingebracht werden, um über solche chemisch stabile Varianten Hemmstoffe mit neuen vorteilhaften Eigenschaften zu entwerfen. Dieses Konzept der Einführung von neuartigen, teils sehr hydrophoben Aminosäuren wurde bereits 1992 von SCHULTZ *et. al* erfolgreich an T4L Lysozym durchgeführt.^[32] SCHULTZ *et. al.* konnten vorteilhafte Auswirkungen auf die Proteinstabilität bei Einbringung von hydrophoben Aminosäuren wie beispielsweise S,S-2-Amino-4-methylhexansäure (siehe Abbildung 17) in hydrophobe Bereiche des Protein beobachten.^[32]

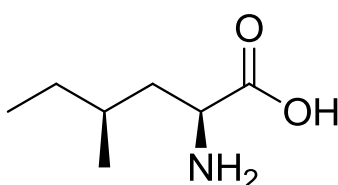


Abbildung 17: Struktur von S,S-2-Amino-4-methylhexansäure.

Dieses bereits erfolgreich angewendete Konzept sollte nun im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden, um den peptidischen Inhibitor PKI zu optimieren. Neben der Optimierung hydrophober Interaktionen durch Einführung der sehr hydrophoben Adamantyl-Gruppen, sollte ebenfalls versucht werden, stark vororientierte Geometrien des Inhibitors durch die rigiden β - und γ -Adamantyl-Aminosäuren einzustellen. Letztlich wurde versucht, durch die Reduzierung der Freiheitsgrade die Affinität der peptidischen Inhibitoren zu verbessern. Dies tritt beispielsweise durch den Ersatz von Isoleucin, dessen Seitenkette konformativ flexibel ist, gegen eine in der Seitenkette sehr rigide Adamantyl-Aminosäure auf. Im Rahmen dieser Arbeit sollten neben den Molekulardynamik-Simulationen Bindungsaffinitäten der neuen Peptide gemessen und Strukturen der Komplexe der Peptide mit der PKA mittels kristallographischer Methoden bestimmt werden.

Die Arbeitsgruppe GEYER entwickelt neue Ribo-Aminosäuren. Diese Aminosäuren sind Serine, Threonine oder Tyrosine, in deren Seitenkette die Hydroxygruppe mit einer Ribose glycolysiert ist. Neben der erhöhten Anzahl an Hydroxygruppen, die in der Lage sind, Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Proteins auszubilden, bietet die Einführung von Ribo-Aminosäuren in ein peptidisches Substrat einen Ansatzpunkt für sich selbst findende Komplexe.

Ribosen sind in der Lage unter wässrigen Bedingungen mit Schwermetall-Ionen wie Lanthan oder Yttrium, aber auch mit Boronsäuren Reaktionen einzugehen.^[33] Insbesondere die Reaktionen mit Boronsäuren erschienen hinsichtlich dieses Projektes vorteilhaft. Wie bereits in Kapitel I erwähnt bieten sich selbst findende Komplexe aus mehreren einzelnen Komponenten entropische Vorteile, die zur Verbesserung von Bindungsaffinitäten führen können. Bei der Reaktion von Boronsäuren mit Ribosen werden weiterhin zwei Moleküle Wasser abgespalten, die diese entropischen Vorteile noch verstärken sollten. Im Rahmen dieses Projektes sollte versucht werden, die Ribo-Aminosäuren innerhalb des peptidischen Liganden PKI einzuführen, um einen Ansatzpunkt für Reaktionen mit Boronsäuren zu erhalten. Anschließend sollten Derivate des literaturbekannten, hochaffinen Inhibitors Fasudil, der innerhalb der ATP-Bindetasche bindet, mit einer Phenylboronsäure-Gruppe synthetisiert werden. Die in Folge der Bindung der Fasudil-Derivate an die PKA in Richtung der Peptid-Bindetasche ausgerichtete Phenylboronsäure sollte analog wie in DMSO NMR-spektroskopisch durch Dr. ROMINA KIRSCHNER nachgewiesen, in Lösung mit der Ribose des peptidischen Liganden reagieren und somit beide Bindestellen verknüpfen.^[34] Weiterhin sollte eine Boronsäure-haltige Aminosäure in den peptidischen Liganden eingeführt werden. Die in Richtung der ATP-Bindestelle ausgerichtete Boronsäure sollte sich analog zu der Reaktion zwischen der Ribo-Aminosäure und dem Boronsäure-Fasudil mit den Ribosebausteinen von ATP, ADP oder AMP verknüpfen lassen (siehe Abbildung 18). Auf diese Weise sollten hochaffine, durch die Verknüpfung mit der Peptid-Bindestelle hochselektive, neuartige Inhibitoren erhalten werden, die wie in Abbildung 18 veranschaulicht aufgebaut sind.

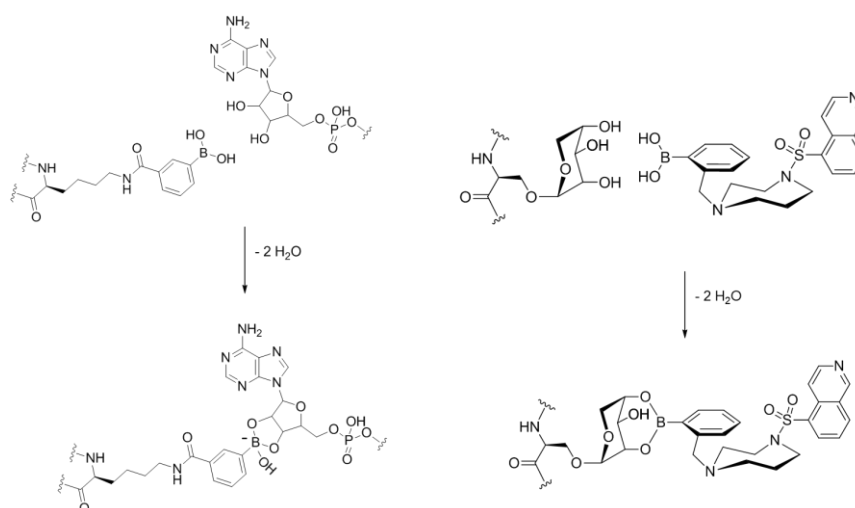


Abbildung 18: Erhoffte Komplexbildung von Boronsäure-Aminosäure mit Adenosinphosphat (links) und Ribo-Aminosäuren mit Boronsäure-Fasudilen (rechts).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Ribo-Aminosäuren Riboserin (RBS) und Ribothreonin (RBT), sowie die Boronsäure-Aminosäure (BAR) in peptidische Liganden eingeführt werden (siehe Abbildung 19).

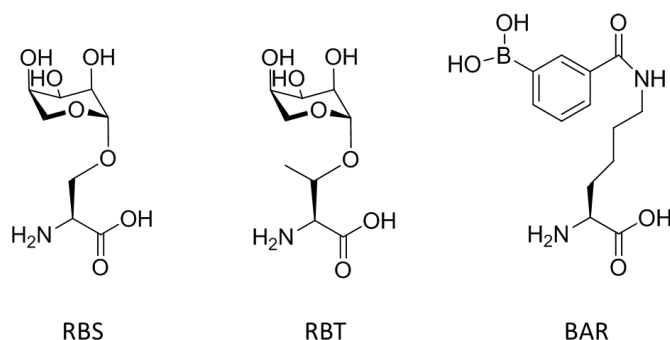


Abbildung 19: Struktur der in dieser Arbeit verwendeten Aminosäuren RBS, RBT und BAR.

Zur Reaktion mit den Ribo-Aminosäuren sollten die Fasudil-Derivate Boron-Fasudil (BFS) und das deutlich flexiblere Boron-Fasudil-Flexibel (BFF) (siehe Abbildung 20) in der ATP-Bindestelle gebunden werden.

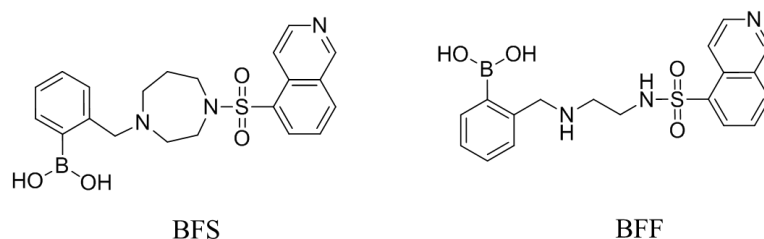


Abbildung 20: Struktur der in dieser Arbeit verwendeten Fasudil-Derivate BFS und BFF.

Mithilfe kristallographischer Strukturaufklärung sollte die vielversprechendste Position zur Einbringung der neuen Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren in das Peptid ermittelt werden, um Verknüpfungen mit Fasudil-Derivaten oder Adenosinphosphaten zu erreichen. Nach der Ermittlung der korrekten Position sollten Strukturen der Komplexe zwischen den neuen Peptiden, Fasudil-Derivaten beziehungsweise Adenosinphosphaten und der PKA bestimmt werden. Diese Strukturen sollten hinsichtlich der Verknüpfung der Bausteine, der idealen Geometrie zum Design verbesserter Bausteine und möglicher ligandeninduzierter Effekte untersucht werden. Weiterhin sollten die Bindungsaffinitäten aller neu dargestellten peptidischen und nicht peptidischen Liganden bestimmt werden.

Von den Kooperationspartnern des Arbeitskreises SCHREINER wurden die Adamantyl-Aminosäuren bezogen, der Arbeitskreis GEYER lieferte sämtliche neuen Peptide sowie die neuartigen Fasudil-Derivate.

IV Ergebnisse und Diskussion

1. Rekombinante Produktion der cAMP-abhängigen Proteinkinase A aus chinesischen-Hamster-Ovarien (CHO PKA)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der katalytischen Einheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) gearbeitet, die in den Ovarien-Zellen des chinesischen Hamsters (*chinese hamster ovaries*, CHO) produziert wird. Sie wurde rekombinant in *Escherichia coli* produziert und aufgereinigt. Dabei wurde eine Vorschrift von Dr. BARBARA WIENEN-SCHMIDT verwendet, mit der das Protein in ausreichender Menge und Reinheit erhalten werden konnte.^[35]

2. Strukturvorschläge von Adamantyl-Peptiden mittels MD-Simulationen

Vor der Synthese neuer Peptide mit Adamantyl-Aminosäuren musste beurteilt werden, an welcher Stelle im literaturbekannten PKI die Einführung einer solchen Aminosäure zu vorteilhaften Eigenschaften führen könnte. Hierfür wurden in Zusammenarbeit mit T. WULSDORF und Dr. A. METZ Molekuldynamik-Simulationen durchgeführt, mit denen die Bindung beziehungsweise Stabilität von modellierten Adamantyl-Peptiden an die PKA untersucht wurden. Dabei wurden sämtliche möglichen Variationen des PKI modelliert, die einen Austausch von einer oder mehrerer Aminosäuren gegen genau eine Adamantyl-Aminosäure enthielten. Bei Adamantyl-Aminosäuren, die racemisch vorliegen konnten, wurden beide Enantiomere in den Simulationen verwendet. Nach Beurteilung der Simulationen wurde eine Liste von interessanten Strukturvorschlägen erstellt und zur Synthese vorgeschlagen (Abbildung 96 im Anhang).

3. Etablierung von Bindungsassays

3.1 Beurteilung von geeigneten Assay-Methoden

Zur Verifikation der neuen Konzepte und zur Evaluation der Bindungseigenschaften der neu synthetisierten Liganden an die PKA musste zu Beginn der Arbeit ein geeigneter Bindungsassay etabliert werden.

Die Methode der isothermalen Titrations-Kalorimetrie (ITC), die neben der Beurteilung der Bindungsaffinitäten ebenfalls Information über die thermodynamischen Beiträge zur Bindung liefert, wurde bereits im Vorfeld verworfen, da die hierfür benötigten großen Mengen an Ligand nicht bereitgestellt werden konnten. Bei der Synthese der neuartigen Verbindungen von Dr. ROMINA KIRSCHNER im Arbeitskreis GEYER konnten nur Ausbeuten im niedrigen Milligramm-Bereich erhalten werden, sodass eine Assay-Methode gewählt werden musste, die mit geringen Mengen an Ligand verlässliche Ergebnisse erzielen kann. Die Methode der *Surface-Plasmon-Resonance* (SPR), die zusätzlich zu Bindungsaffinitäten Aussagen über die Kinetik der Bindungen liefern kann, wurde ebenfalls als ungeeignet beurteilt, da eine hierfür benötigte Immobilisierung des Proteins zu strukturellen Änderungen führt, die die Bindungseigenschaften von Liganden verändern könnte. Die Bindungseigenschaften der Liganden an die PKA sollte jedoch im nativen Zustand des Proteins bestimmt werden. Die Methoden der mikroskalierten Thermophorese (MST) und des *Thermal-Shift*-Assays (TSA) wurden als geeignet erachtet und im Rahmen der Arbeit wurde versucht, ein Bindungsassay unter Verwendung dieser Methoden zu etablieren.

3.2 Erste Versuche zur Etablierung des Mikroskalierten Thermophorese-Assay

3.2.1 Fluoreszenzmarkierung („*Labeling*“) der Proteinkinase A

Zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten in einem MST-Assay muss entweder der Ligand oder das Protein eine Fluoreszenz aufweisen, die vom verwendeten Messgerät detektiert werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Liganden gearbeitet, die keine eigene Fluoreszenz aufwiesen, weshalb sie nicht vom Messgerät detektiert werden konnten. Die PKA weist eine Eigenfluoreszenz aufgrund der enthaltenen Tryptophane auf, das verwendete Messgerät (Monolith NT.115) war jedoch nicht darauf ausgelegt, diese Form der Fluoreszenz zu detektieren, weshalb zuerst eine fluorogene Gruppe, die für das Gerät geeignet war, an das Protein angeknüpft werden musste. Diese Fluoreszenzmarkierung, auch „*Labeling*“ genannt, musste etabliert werden, bevor die PKA im Assay verwendet werden konnte.

Von der Firma Nanotemper Technologies, die das verwendete Monolith NT.115 vertreibt, liegen zwei für dieses Gerät geeignete Reaktions-*Kits* zur Fluoreszenzmarkierung vor. Eines dieser *Kits* knüpft eine fluorogene Gruppe kovalent an lösungsmittelzugängliche Cysteine der Proteine, das andere knüpft diese Gruppe mit exponierten Lysinen.

Da die Markierung von für die Ligandenbindung essentiellen Aminosäuren zum Verlust von Bindungsaffinitäten führen kann, musste im ersten Schritt entschieden werden, welches dieser *Kits* verwendet werden sollte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS (Amine Reactive)* verwendet, das Lysine markiert, da nach genauerer Analyse der Proteinoberfläche davon auszugehen war, dass die Bindetasche hierdurch nicht signifikant beeinflusst werden sollte.

Die Effizienz der *Labeling*-Reaktion ist maßgeblich von dem verwendeten Buffer abhängig. Neben dem pH-Wert und den Puffersalzen, die die Reaktivität beeinflussen, müssen primäre Amine und DTT aus dem Puffer entfernt werden, da sie Nebenreaktionen eingehen. Nach der Aufreinigung liegt das Protein in einem HEPES-Puffer vor, der DTT enthält. Da DTT die Reaktion stören würde, musste das Protein in einem ersten Schritt in einen neuen Puffer überführt werden. Im verwendeten *Kit* liegen hierfür Pufferaustausch-Säulen vor. Das Protein wurde nach der Vorschrift des *Kits* in den enthaltenen *Labeling-Buffer*, der für die Fluoreszenzmarkierung optimiert ist, überführt und durch Verdünnung auf eine Konzentration von $10\text{-}15\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ eingestellt.

Die Standard-Vorschrift des *Kits* empfiehlt im darauffolgenden Markierungsschritt eine Farbstofflösung zu verwenden, deren Konzentration der 2-3-fachen Konzentration des Proteins entspricht. In Fällen, in denen das *Labeling* nur in geringem Maße stattfindet, wird empfohlen, die Konzentration des Farbstoffes zu erhöhen. In den ersten Tests wurde vorsorglich eine Farbstoffkonzentration, die dem 4-5-fachen der Proteinkonzentration entsprach, verwendet. Nach Aufreinigung und dabei erfolgreichem Pufferaustausch in Assaypuffer O1 für MST (siehe Kapitel VI) entsprechend der Anleitung des *Kits* wurde die Konzentration von Protein und Farbstoff bestimmt. Bereits im ersten Versuch konnte ein Verhältnis von 1:1 von Protein und Farbstoff erhalten werden. Dieses ideale Verhältnis zeigt an, dass im Durchschnitt jedes Proteinmolekül mit genau einer fluorogenen Gruppe markiert wurde. Da dieses Ergebnis ideal ist, wurde der Prozess der Fluoreszenzmarkierung nicht weiter optimiert und für alle weiteren Versuche analog durchgeführt. Der detaillierte *Labeling*-Prozess ist im Material und Methodenteil beschrieben.

3.2.2 Reduzierung von Aggregations- und Adhäsionseffekten

In einem MST-Assay wird die Diffusion von Molekülen entlang eines Temperaturgradienten detektiert. Diese Diffusion wird durch die Bindung von Liganden beeinflusst, was die Bestimmung einer Bindungsaffinität ermöglicht. Aggregationseffekte des Proteins oder Adhäsionen an die verwendeten Glaskapillaren können die Diffusion jedoch ebenfalls so maßgeblich beeinflussen, dass eine Affinitätsbestimmung nicht möglich ist. Vor der Durchführung von Messreihen muss daher zuerst getestet werden, ob Detergenzien wie Tween 20 oder Bovines Serum-Albumin (BSA) als Zusatz verwendet werden müssen.

Nach der Etablierung des *Labelings* wurden Thermophoresekurven mit und ohne Zugabe von Tween 20 aufgenommen. Diese sind in Abbildung 21 gezeigt.

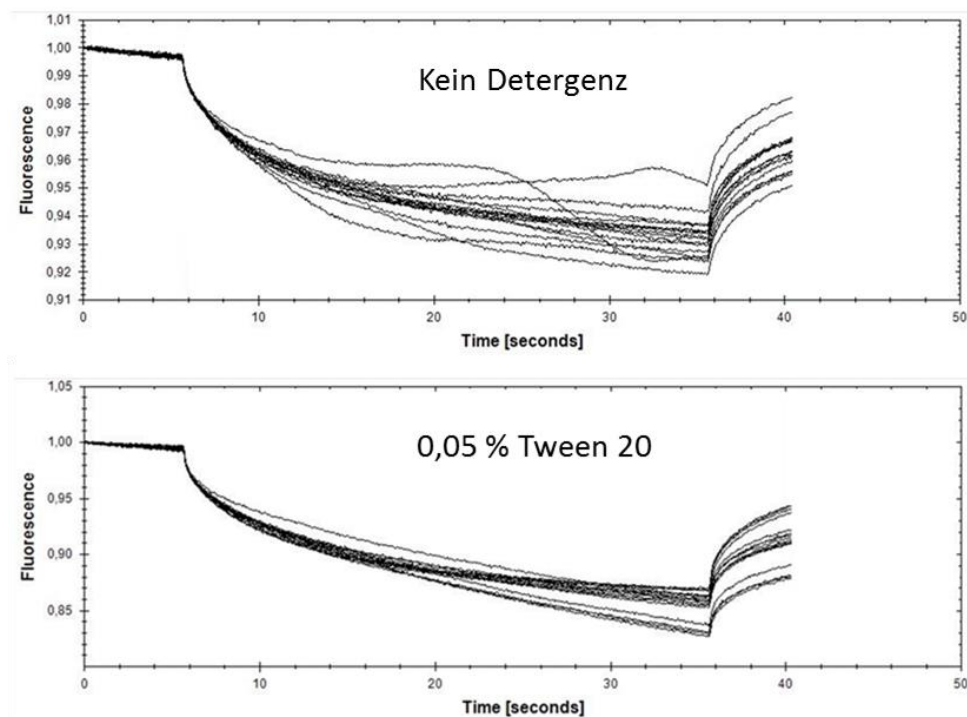


Abbildung 21: Auftragung der gemessenen Fluoreszenz gegen die Zeit bei Messungen von Thermophoresekurven mit und ohne Detergenz. Die unregelmäßig verlaufenden Kurven ohne Zugabe eines Detergenzes zeigen das Vorliegen von Aggregations- oder Adhäsionseffekten.

Es zeigte sich, dass ohne Zugabe von Detergenzien die Kurven unregelmäßig verlaufen und Buckel aufweisen. Diese Messbedingungen sind somit ungeeignet. Bei Zugabe von 0,05 % Tween 20 sind die Kurven regelmäßig und ohne Buckel. Die Zugabe eines Detergenzes ist somit in der Lage die Qualität der Kurven zu verbessern.

Jedoch wiesen die Kurven selbst mit Zugabe eines Detergenz keinen idealen Verlauf auf, weshalb weitere Optimierungen durchgeführt werden mussten. Diese weiteren Optimierungen wurden in dem Assaypuffer O2 für MST (siehe Kapitel VI) durchgeführt.

Zur Bestimmung der korrekten Konzentration des Fluorophores in den Proben kann ein sogenannter Kapillarscan durchgeführt werden. Dieser misst die Fluoreszenz innerhalb der befüllten Kapillaren und erlaubt somit die Anpassung der Konzentration. Neben der Intensität der Fluoreszenz lässt sich aufgrund der Form der Fluoreszenz-Spitzen eine Aussage über eventuelle Adhäsionseffekte des Proteins an das Kapillarmaterial treffen. Bei den ersten Messungen wurden keine Adhäsionseffekte detektiert, die Kurven lieferten jedoch Anzeichen dafür, dass dennoch solche Effekte eine Rolle zu spielen schienen.

Da die Adhäsionseffekte sich bei längerem Verweilen der Proteinlösung in den Kapillaren verstärken können, wurden die Proben der nächsten Messung mehrfach im Abstand von etwa 5 Minuten vermessen. Ebenfalls wurden die Proben in Kapillaren ohne Beschichtung und Kapillaren mit hydrophober oder hydrophiler Beschichtung getestet. Die dabei erhaltenen Kapillarscans sind in Abbildung 22 gezeigt.

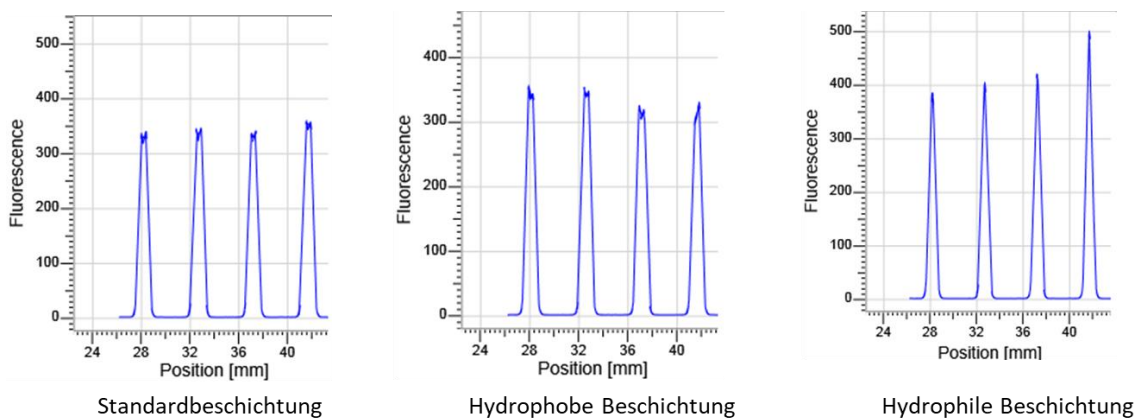


Abbildung 22: Kapillarscans der mit Proteinlösung befüllten, unterschiedlich beschichteten Kapillaren. Aufgetragen sind die Intensität der Fluoreszenz in den Kapillaren gegen die Position der Kapillaren im Messgerät. Der Kapillarscan in Standard und hydrophob beschichteten Kapillaren zeigt das Auftreten von Doppelspitzen.

Bei der Vermessung nach einer gewissen Inkubationszeit wurden in den Kapillarscans Doppelspitzen festgestellt. Diese Doppelspitzen zeigten, dass das Protein in gewissem Maße an den Kapillarwänden adhäsionierte.

Aufgrund der direkt nach der Befüllung der Kapillaren erfolgten Messung in den ersten Versuchen, wurden die Adhäsionseffekte nicht beim Kapillarscan entdeckt, sondern erst aufgrund eines suboptimalen Verlaufs der Kurven vermutet. Durch die längere Verweilzeit in den Kapillaren wurden die Adhäsionseffekte verstärkt und konnten entdeckt und durch die Verwendung von hydrophil beschichteten Kapillaren eliminiert werden. Weitere Messungen wurden nur in den hydrophil beschichteten Kapillaren und ihrem Nachfolgemodell, den Premium-beschichteten Kapillaren durchgeführt. In Abbildung 23 ist eine mit diesen neuen Messbedingungen erhaltene Messkurve gezeigt.

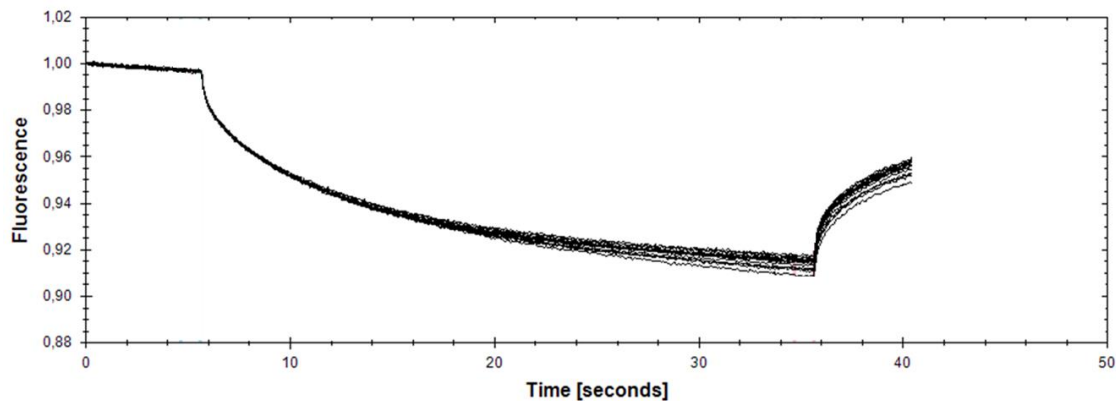


Abbildung 23: Auftragung der gemessenen Fluoreszenz gegen die Zeit bei Messungen von Thermophoresekurven mit hydrophil beschichteten Kapillaren.

3.2.3 Erste Messungen mit peptidischen Liganden

Nach der Etablierung der Fluoreszenzmarkierung und der Eliminierung der Aggregations- und Adhäsionseffekte konnten Thermophoresekurven mit auswertbaren Kurvenverläufen erhalten werden. Unter den optimierten Bedingungen wurden die ersten Affinitätsbestimmungen von peptidischen Liganden an die Proteinkinase A durchgeführt. In der Literatur war für PKI⁵⁻²⁴ zur Proteinkinase A eine Affinität von $2,3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ angegeben, die mittels eines Phosphorylierungsassays bestimmt worden war.^[21] Zur Ermittlung von korrekten Ligandenkonzentrationen in den MST-Messungen wurde diese Affinität als korrekte Referenz angekommen und mittels einer Online-Software zur Simulation von Bindungskurven der Firma Nanotemper Technologies eine Verdünnungsreihe entworfen. Die simulierte Bindungskurve ist in Abbildung 24 gezeigt.

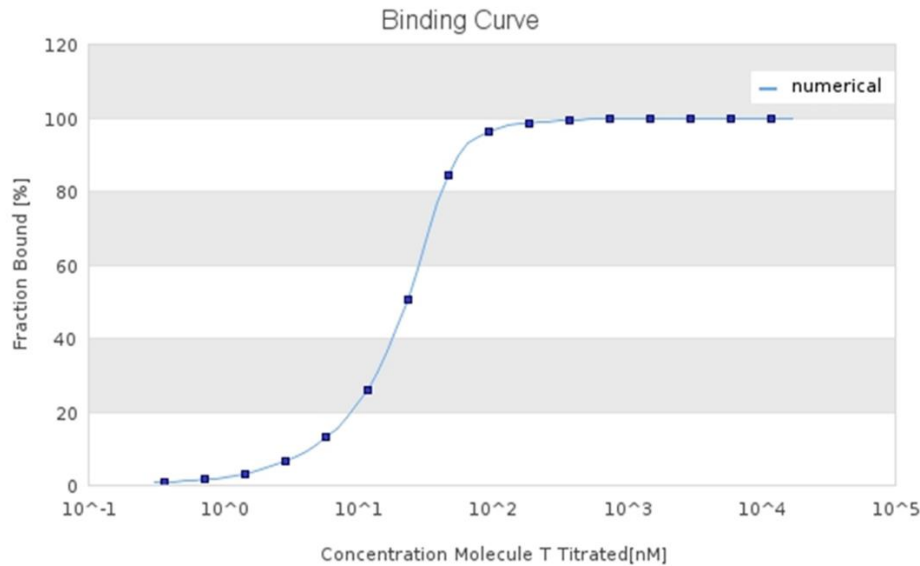


Abbildung 24: Simulierte Bindungskurve einer MST-Messung eines Liganden mit einer Affinität von $2,3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ gegen eine Proteinkonzentration von $70 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Aufgetragen sind die Konzentration an Ligand gegen die prozentual gebundene Menge von Ligand an das Protein.

Als Bedingungen für die Messreihen wurde eine Startkonzentration von $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ des Liganden, eine 1:1 Verdünnungsreihe mit 16 Proben und eine Proteinkonzentration zwischen 30 und $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ gewählt. Da in der Literatur bekannt ist, dass die Zugabe von ATP die Bindungsaffinität peptidischer Liganden beeinflusst, wurden die Messungen sowohl ohne ATP sowie unter Zugabe von $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ des Magnesiumsalzes von ATP durchgeführt.^[21] Jedoch konnte unter Verwendung dieser Ligandenkonzentrationen in Assaypuffer O2 für MST keine Affinität festgestellt werden. Da die Kurvenform, die wie in Abbildung 23 gezeigt verlief, auf keinerlei Probleme bei der Diffusion hinwies, wurde vermutet, dass die Bindung von PKI⁵⁻²⁴ an die PKA unter den hierbei verwendeten Bedingungen nicht oder nur mit einer deutlich schlechteren Affinität stattfindet. Zur Bestätigung dieser Vermutung und Ermittlung günstiger Pufferbedingungen wurde zunächst die Etablierung eines *Thermal-Shift-Assays* (TSA) begonnen.

3.3 Ermittlung korrekter Bedingungen mittels eines *Thermal-Shift-Assays* (TSA)

3.3.1 Bestimmung der Proteinstabilität zur Etablierung neuer Messbedingungen

Ein TSA ermöglicht die Bestimmung von Proteinstabilitäten anhand des „Schmelzpunktes“ des Proteins, was der Entfaltungstemperatur des Proteins entspricht. Dieser wird maßgeblich durch Pufferbedingungen beeinflusst, kann jedoch auch bei Zugabe von Liganden und Cofaktoren verschoben werden. Dabei können stabilisierende oder destabilisierende Effekte auftreten, die durch freigesetzte oder aufgewendete Bindungsenergie verursacht werden. Zu Beginn der Tests mit dem TSA wurde versucht, eine Bedingung ausgehend vom im MST-Assay verwendeten Puffer zu finden, bei der das Protein stabil vorliegt und die Bindung eines Peptides durch eine Schmelzpunktverschiebung des Proteins detektiert werden kann. Da in der Literatur beschrieben ist, dass die Zugabe von ATP und Magnesium die Bindungsaffinität von Peptiden beeinflusst, sollte dieser Effekt der Zugabe dieser beiden Substanzen ebenfalls getestet werden.^[21] Zu Beginn wurde angenommen, dass das natürliche Substrat ATP keine negative Wirkung auf das Protein ausübt und selbst hohe Konzentrationen toleriert werden. Es wurde somit zuerst versucht, eine Konzentration zu bestimmen, bei der das Protein mit ATP gesättigt vorliegt. Da in verschiedenen Kristallstrukturen der PKA (beispielsweise 3FJQ) zwei Magnesiumionen an das in der Bindetasche befindliche ATP koordinieren, sollte gleichzeitig der Effekt von Magnesium auf das mit ATP gesättigte Protein getestet werden. Die hierbei getesteten Konzentrationen, sowie die Schmelzpunktergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2: Gemessene Schmelzpunkte der PKA unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an Magnesiumchlorid und ATP Natriumsalz.

	0 mmol · L ⁻¹	5 mmol · L ⁻¹	10 mmol · L ⁻¹	15 mmol · L ⁻¹	20 mmol · L ⁻¹	25 mmol · L ⁻¹
	MgCl ₂	MgCl ₂	MgCl ₂	MgCl ₂	MgCl ₂	MgCl ₂
0 mmol · L ⁻¹ Na ₂ ATP	45,8±0,3 °C	45,7±0,3 °C	46,0±0,0 °C	46,3±0,3 °C	45,7±0,3 °C	45,5±0,0 °C
10 mmol · L ⁻¹ Na ₂ ATP	35,8±0,3 °C	32,2±0,6 °C	25,5±0,0 °C	37,0±1,0 °C	26,2±1,8 °C	25,0±1,3 °C
20 mmol · L ⁻¹ Na ₂ ATP	<10,00 °C	<10,00 °C	<10,00 °C	<10,00 °C	<10,00 °C	<10,00 °C
30 mmol · L ⁻¹ Na ₂ ATP	<10,00 °C	<10,00 °C	<10,00 °C	<10,00 °C	<10,00 °C	<10,00 °C

Alle Proben enthielten 50 mmol · L⁻¹ HEPES, 500 mmol · L⁻¹ NaCl und waren bei pH 7,0.

Es zeigte sich, dass die PKA in den Bedingungen ohne Magnesiumchlorid und ATP einen Schmelzpunkt von etwa 46 °C aufwies. Die Zugabe von Magnesiumchlorid zeigte bis zu einer Konzentration von 15 mmol · L⁻¹ einen sehr schwachen stabilisierenden Effekt, dieser fiel somit in einen nicht signifikanten Bereich. Erst eine Stabilisierung oder Destabilisierung von > 1 °C kann als signifikant angesehen werden. Die Zugabe von ATP dagegen sorgte für einen stark destabilisierenden Effekt. Bereits eine Konzentration von 10 mmol · L⁻¹ sorgte für eine Verschiebung des Schmelzpunktes um 10 °C. Konzentrationen aufwärts von 20 mmol · L⁻¹ sorgten für eine so starke Destabilisierung, dass das Protein selbst bei 10 °C bereits denaturiert vorlag.

Ebenfalls wurde versucht, den Schmelzpunkt des Proteins unter Zugabe von 0,1 mmol · L⁻¹ bzw. 0,08 mmol · L⁻¹ PKI⁵⁻²⁴ und ATP zu bestimmen. Ein Einfluss von PKI⁵⁻²⁴ konnte hierbei jedoch nicht detektiert werden. Die Ergebnisse waren analog zu den vorher durchgeführten Messreihen von ATP ohne Zugabe von Magnesiumchlorid.

Es zeigte sich somit, dass das Protein unter den ATP-haltigen Bedingungen, die im MST-Assay Anwendung fanden, nicht stabil ist und das Enzym nicht in einem aktiven Zustand vorlag. Das Ausbleiben einer Bindungsaffinität im MST war daher nicht auf den Liganden, sondern auf die verwendeten Bedingungen zurückzuführen. Weiterhin konnten unter den im MST verwendeten Bedingungen auch im TSA keine Interaktion von PKI⁵⁻²⁴ mit dem Protein festgestellt werden. Dies legte den Verdacht nahe, dass die Messbedingungen nicht optimal waren und weitere Optimierungen vonnöten waren. Aufgrund der Vermutung, dass die Konzentration an ATP zu hoch war, wurden erneut Messungen mit verschiedenen Konzentrationen an Magnesiumchlorid und ATP durchgeführt, die eher physiologischen Konzentrationen entsprachen. Ebenfalls wurde die Konzentration von Natriumchlorid von 500 mmol · L⁻¹ auf 100 mmol · L⁻¹ reduziert. Die hierbei getesteten Konzentrationen, sowie die Schmelzpunktergebnisse sind in Tabelle 3 gezeigt und in Abbildung 25 graphisch aufgetragen.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3: Gemessene Schmelzpunkte der PKA unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an Magnesiumchlorid und ATP Natriumsalz.

	0 mmol · L ⁻¹ MgCl ₂	0,8 mmol · L ⁻¹ MgCl ₂	1,6 mmol · L ⁻¹ MgCl ₂	5 mmol · L ⁻¹ MgCl ₂
0 mmol · L ⁻¹ Na ₂ ATP	46,8±0,2 °C	47,0±0,0 °C	47,0±0,0 °C	47,3±0,2 °C
1,25 mmol · L ⁻¹ Na ₂ ATP	46,7±0,5 °C	48,0±0,7 °C	50,0±0,0 °C	51,2±0,2 °C
2,50 mmol · L ⁻¹ Na ₂ ATP	46,2±0,2 °C	47,2±0,3 °C	49,0±0,0 °C	51,8±0,2 °C
3,75 mmol · L ⁻¹ Na ₂ ATP	46,0±0,0 °C	46,7±0,2 °C	47,5±0,0 °C	51,2±0,2 °C
5,00 mmol · L ⁻¹ Na ₂ ATP	45,5±0,4 °C	45,8±0,2 °C	46,5±0,0 °C	50,0±0,0 °C
6,25 mmol · L ⁻¹ Na ₂ ATP	44,0±1,0 °C	45,0±0,0 °C	45,3±0,2 °C	48,2±0,2 °C
7,50 mmol · L ⁻¹ Na ₂ ATP	44,0±0,0 °C	44,0±0,0 °C	44,3±0,2 °C	44,7±0,2 °C
8,75 mmol · L ⁻¹ Na ₂ ATP	42,3±0,6 °C	42,7±0,2 °C	42,3±0,2 °C	42,0±0,4 °C

Alle Proben enthielten 50 mmol · L⁻¹ HEPES, 100 mmol · L⁻¹ NaCl und waren bei pH 7,0.

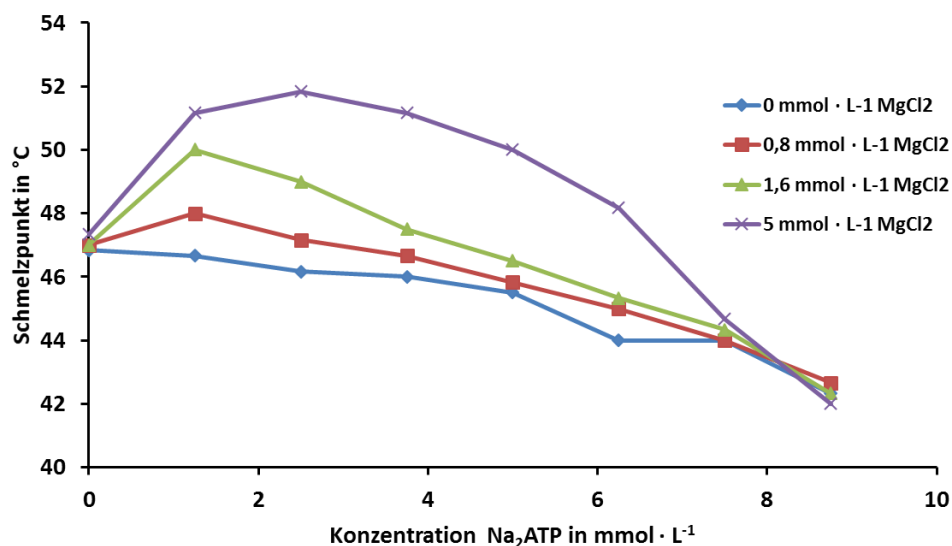


Abbildung 25: Auftragung des Schmelzpunktes der Proteinkinase A in Abhängigkeit der Na₂ATP-Konzentration bei verschiedenen Konzentrationen von MgCl₂. Alle Proben enthielten 50 mmol · L⁻¹ HEPES, 100 mmol · L⁻¹ NaCl und waren bei pH 7,0.

Es zeigte sich, dass die Zugabe von ATP bis zu einer Konzentration von $7,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ vom Protein toleriert wird. Höhere Konzentrationen an ATP führen zu einer starken Destabilisierung. Der destabilisierende Effekt von ATP wird durch die Zugabe von Magnesiumchlorid abgemildert, bei niedrigen Konzentrationen von ATP ist Magnesiumchlorid sogar in der Lage das Protein zu stabilisieren. Diese stabilisierende Wirkung tritt nur in Anwesenheit von ATP auf, ohne ATP konnte durch die Zugabe von Magnesiumchlorid keine Stabilisierung des Proteins beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für diesen kooperativen Effekt von ATP und Magnesium-Ionen ist in den literaturbekannten Kristallstrukturen der Proteinkinase (siehe Abbildung 11) zu finden. In diesen Strukturen wird das in der Bindetasche vorliegende ATP durch zwei Magnesium-Ionen komplexiert. Ohne ATP werden diese Magnesium-Ionen nicht an die PKA koordiniert (vergleiche Kapitel 6) und können somit keinen stabilisierenden Effekt ausüben.

Bei der Affinitätsbestimmung der peptidischen Liganden waren unter anderem Messungen geplant, bei denen die PKA mit ATP gesättigt vorliegt, da in der Literatur die Abhängigkeit der Bindungsaffinität solcher Liganden von der ATP-Konzentration berichtet wird.^[18] Somit wurde versucht, eine Pufferbedingung zu finden, bei der ATP in möglichst hoher Konzentration toleriert wird und das Protein möglichst stabil vorliegt. Bei den vorangegangenen Messungen wurde festgestellt, dass eine ATP-Konzentration von $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ noch verhältnismäßig gut toleriert wird und bei höheren Konzentrationen die Proteinstabilität abnimmt. Die Konzentration von $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ wurde als guter Kompromiss und somit geeignet für zukünftige Assays beurteilt. Zur Optimierung des kooperativen Effektes von ATP und Magnesium-Ionen wurden weitere Messungen mit festgelegter Konzentration an ATP und variabler Konzentration an Magnesiumchlorid durchgeführt. Die hierbei getesteten Konzentrationen, sowie die Schmelzpunktergebnisse sind in Tabelle 4 gezeigt und in Abbildung 26 graphisch aufgetragen.

Tabelle 4: Gemessene Schmelzpunkte der PKA unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an Magnesiumchlorid.

Konzentration MgCl_2 in $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0,0	2,5	5,0	7,5	10	12,5	15,0
Schmelzpunkt in $^{\circ}\text{C}$	$44,2 \pm 0,0$	$46,5 \pm 0,0$	$48 \pm 0,4$	$48,5 \pm 0,0$	$48,5 \pm 0,0$	$48,3 \pm 0,2$	$48,0 \pm 0,4$

Alle Proben enthielten $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2ATP und waren bei pH 7,0

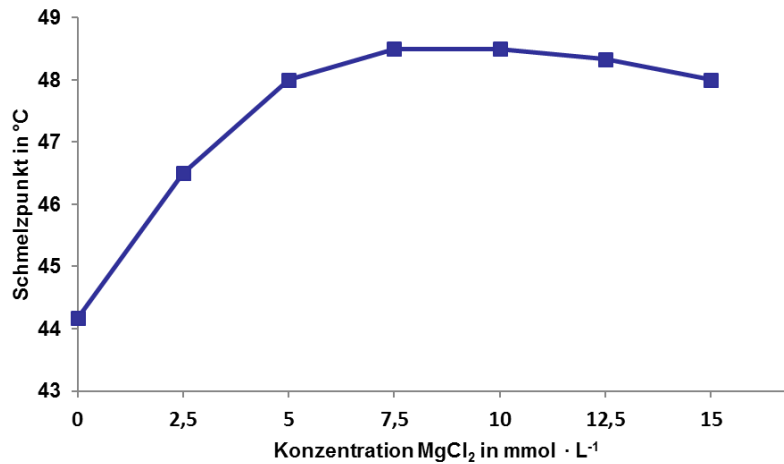


Abbildung 26: Auftragung des Schmelzpunktes der Proteinkinase A in Abhängigkeit der MgCl_2 -Konzentration bei verschiedenen Konzentrationen von MgCl_2 . Alle Proben enthielten $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2ATP und waren bei pH 7,0.

Die Messungen zeigten, dass der kooperative Stabilisierungseffekt bis zu einer Konzentration von $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Magnesiumchlorid zunimmt. Höhere Konzentrationen führen zu keiner verbesserten Stabilität.

Aufgrund der nun ermittelten höchstmöglichen Konzentration an ATP und der Optimierung des kooperativen Effekts zwischen ATP und Magnesium-Ionen, wurde ein Puffer mit $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2ATP , $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 und einem pH-Wert von 7,0 als geeignet für die Assays beurteilt.

3.3.2 TSA-Versuche mit optimierten Messbedingungen

Mithilfe des *Thermal-Shift*-Assays konnten Bedingungen ermittelt werden, bei denen ATP in erhöhter Konzentration toleriert wurde. Hinsichtlich der Eignung der neuen Bedingungen zur Ermittlung von Bindungsaffinitäten konnte jedoch zu diesem Zeitpunkt noch keine Aussage getroffen werden.

Bei der Bindung von Liganden an ein Protein kann, entsprechend zu der aufzuwendenden beziehungsweise freigesetzten Bindungsenergie, die Stabilität des Proteins und somit der Schmelzpunkt verändert werden. Je nach Beschaffenheit der Bindestelle und Art der Interaktionen vom Liganden zu dem Protein kann die Stabilität des Proteins erhöht werden, verringert werden oder unbeeinflusst bleiben.

Das Fehlen einer Schmelzpunktverschiebung bei Zugabe eines Liganden ist zwar ein Indiz für ein Ausbleiben der Bindung, sichere Aussagen liefern jedoch nur Bindungsassays wie MST oder ITC und proteinkristallographische Strukturaufklärungen. Nichtsdestotrotz wurde untersucht, ob die Bindung der peptidischen Liganden und deren Abhängigkeit von ATP in einem TSA nachweisbar ist, indem Messungen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Liganden sowohl in An- als auch Abwesenheit von ATP durchgeführt wurden. Die hierbei getesteten Konzentrationen, sowie die Schmelzpunktergebnisse sind in Tabelle 5 gezeigt und in Abbildung 27 graphisch aufgetragen.

Tabelle 5: Gemessene Schmelzpunkte der PKA unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an PKI⁵⁻²⁴.

	0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PKI ⁵⁻²⁴	2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PKI ⁵⁻²⁴	6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PKI ⁵⁻²⁴	10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PKI ⁵⁻²⁴	20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PKI ⁵⁻²⁴	50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PKI ⁵⁻²⁴
0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na ₂ ATP	46,7±0,2 °C	46,8±0,2 °C	47,0±0,0 °C	47,2±0,3 °C	47,5±0,0 °C	47,8±0,2 °C
5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na ₂ ATP	49,5±0,5 °C	50,7±0,2 °C	52,5±0,7 °C	54,2±0,2 °C	56,0±0,2 °C	nicht gemessen

Alle Proben enthielten 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES, 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂ und waren bei pH 7,0.

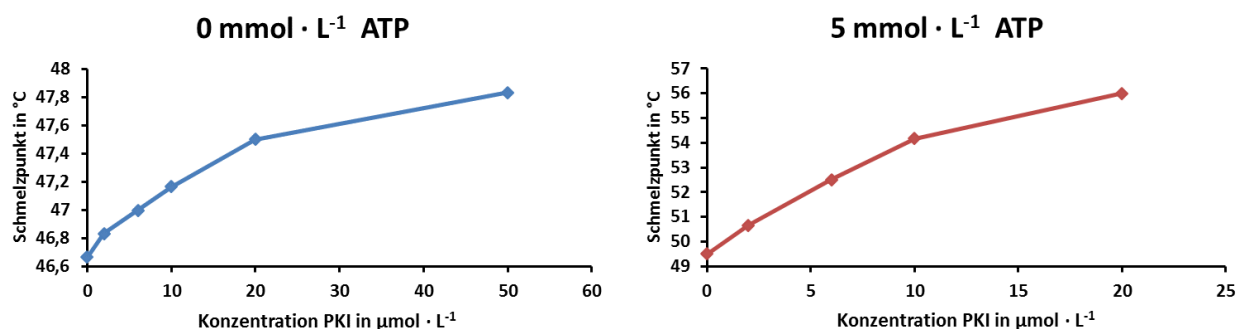


Abbildung 27: Auftragung des Schmelzpunktes der Proteinkinase A in Abhängigkeit der PKI⁵⁻²⁴-Konzentration bei verschiedenen Konzentrationen von Na₂ATP. Alle Proben enthielten 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES, 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂ und waren bei pH 7,0.

Es zeigte sich, dass eine erhöhte Konzentration an peptidischem Liganden einen stabilisierenden Effekt auf die PKA ausübt. Dieser Effekt ist ohne die Zugabe von ATP nur sehr gering und erreicht erst bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ein signifikantes Ausmaß von > 1°C. Bei Zugabe von ATP dagegen beträgt der stabilisierende Effekt bereits bei 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ einen Wert von 6,5 °C.

Im Gegensatz zu den zu Beginn dieser Arbeit durchgeführten Messungen konnte unter den neuen Messbedingungen die Bindung des peptidischen Liganden in Abhängigkeit seiner Konzentration verfolgt werden. Ebenfalls konnte die in der Literatur beschriebene Abhängigkeit der Bindungsstärke von der ATP-Konzentration reproduziert werden.^[21] Im Rahmen der Arbeit wurden unter diesen Bedingungen sämtliche neuen Liganden auf ihre (de-)stabilisierende Wirkung auf die PKA untersucht. Peptidische Liganden wurden mit und ohne Zugabe von ATP getestet, Liganden der *hinge*-Region nur ohne ATP, da ansonsten eine Konkurrenz um die Bindestelle auftreten würde. Die Messergebnisse sind in Kapitel 4 zusammengefasst.

Die neu ermittelten Assay-Bedingungen waren erfolgreich in der Bestimmung der Effekte von Liganden auf den Schmelzpunkt der PKA. Jedoch konnte mithilfe des TSA keine quantitative Aussage über die Bindungsaffinität getroffen werden. Deshalb mussten die Messungen im MST-Assay unter den nun optimierten und im TSA validierten Bedingungen erneut durchgeführt werden, in der Hoffnung, dass unter den neuen Bedingungen die Affinität der Liganden an die PKA quantifiziert werden kann.

3.4 Bestimmung von Bindungsaffinitäten im MST unter den optimierten Bedingungen

Nach der Optimierungsphase der Bedingungen im TSA wurden die Bestimmungen der Bindungsaffinitäten im Thermophorese-Assay wiederholt. Als Bedingungen für die Messreihen wurde eine Startkonzentration des Liganden von $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, eine 1:1 Verdünnungsreihe mit 16 Proben und eine Proteinkonzentration zwischen 30 und $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ gewählt. Die Messungen wurden sowohl ohne ATP sowie unter Zugabe von $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ des Natriumsalzes von ATP durchgeführt. Diese neuen Messbedingungen unterschieden sich von den Anfangsbedingungen in vier Faktoren: Die Messungen fanden im neuen, im TSA ermittelten Assay-Puffer statt; die Ligandenkonzentration wurde erhöht, um auch geringere Bindungsaffinitäten nachweisen zu können; die Konzentration von ATP wurde verringert, um die Proteinstabilität zu gewährleisten und anstelle des Magnesiumsalzes von ATP wurde das Natrium Salz verwendet, um die Konzentration von Magnesium genauer einzustellen.

Die bei der mit diesen veränderten Bedingungen erhaltenen Kurven sind in Abbildung 28 gezeigt.

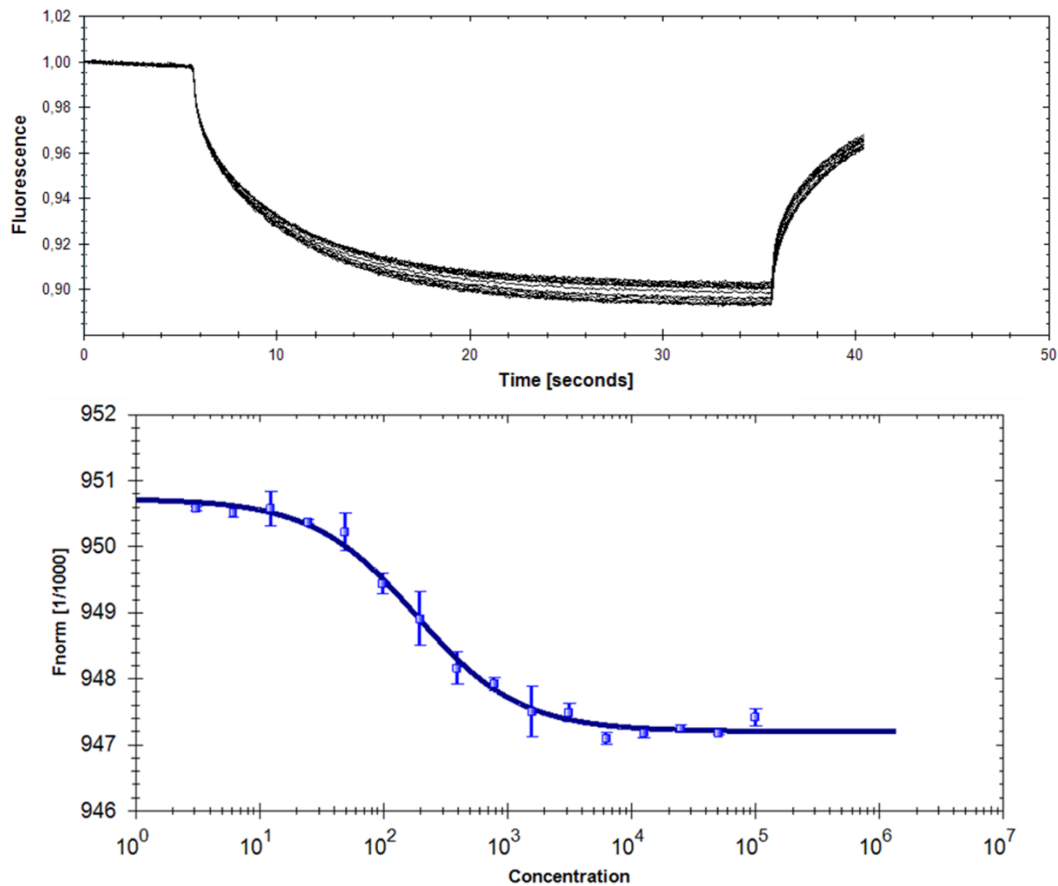


Abbildung 28: Auftragung der gemessenen Fluoreszenz gegen die Zeit bei Messungen von Thermophoresekurven unter den optimierten Bedingungen (oben) und daraus erhaltene Bindungskurve durch Auftragung der normalisierten Fluoreszenz gegen die Ligandenkonzentration (unten). Zur Auswertung wurde die Methode des *Temperature-Jumps* verwendet.

Unter den neuen Messbedingungen konnten Bindungskurven erhalten werden, die die Berechnung einer Bindungsaffinität erlauben. In Abbildung 28 ist eine dieser Kurven gezeigt, die einen idealen, sigmoidalen Verlauf aufweist. Bei niedrigen Konzentrationen des Liganden liegt ein Plateau vor. In diesem Meßbereich liegt das Protein ohne gebundenen Liganden vor. Wird die Konzentration des Liganden erhöht, so tritt ein annähernd linearer Verlauf der normalisierten Fluoreszenz auf. Dies zeigt die langsam zunehmende Sättigung des Proteins mit dem Liganden. Bei sehr hoher Ligandenkonzentration tritt ein erneutes Plateau auf, bei dem das Protein vollständig mit Ligand gesättigt vorliegt. Dieser Kundenverlauf zeigt, dass die neuen ermittelten Bedingungen nicht nur für den TSA, sondern auch zur Affinitätsbestimmung im MST-Assay geeignet sind. Die Ergebnisse der Messungen sind in Kapitel 3 aufgeführt. Einige Werte konnten nicht gemessen werden, da das für den TSA verwendete Gerät nicht für den gesamten Zeitraum der Arbeit zur Verfügung stand.

4. Ergebnisse des *Thermal-Shift*- und Thermophorese-Assays

4.1 Peptidische Liganden mit Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren

4.1.1. Gemessene Affinitäten und Stabilisierungseffekte

In den Assays konnten die in Tabelle 6 gezeigten Ergebnisse für neuartige Peptide mit Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren erhalten werden:

Tabelle 6: In den *Thermal-Shift* und Thermophorese-Assays gemessene Bindungsaffinitäten und Stabilisierungseffekte.

Peptid	K _D aus MST bei 0 mmol · L ⁻¹ ATP	ΔT aus TSA bei 0 mmol · L ⁻¹ ATP, 50 μmol · L ⁻¹ Peptid	K _D aus MST bei 5 mmol · L ⁻¹ ATP	ΔT aus TSA bei 5 mmol · L ⁻¹ ATP, 20 μmol · L ⁻¹ Peptid
PKI ⁵⁻²⁴	Nicht feststellbar	1,17±0,24 °C	144,00±30,00 nmol · L ⁻¹	6,50 ±0,24 °C
PKI ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	0,50±0,29 °C	4,32±0,89 μmol · L ⁻¹	3,50 ±0,00 °C
PKI(RBS ¹³) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	0,17±0,29 °C	2,67±0,35 μmol · L ⁻¹	2,50 ±0,29 °C
PKI(RBS ¹⁸) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	0,00±0,00 °C	Nicht feststellbar	0,17±0,29 °C
PKI(RBS ²⁰) ⁵⁻²²	6,20±5,00 μmol · L ⁻¹	1,00±0,00 °C	29,60±10,00 μmol · L ⁻¹	2,33±0,29 °C
PKI(RBT ¹⁶) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	0,67 ±0,00 °C	26,00±4,65 μmol · L ⁻¹	1,83 ±0,29 °C
PKI(RBS ¹⁹) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	Keine Messung	Nicht feststellbar	Keine Messung
PKI(RBS ¹⁷) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	Keine Messung	93,98±82,59 μmol · L ⁻¹	Keine Messung
PKI(RBS ²¹) ⁵⁻²²	21,86±8,04 μmol · L ⁻¹	Keine Messung	Nicht feststellbar	Keine Messung
PKI(BAR ¹⁸) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	Keine Messung	Nicht feststellbar	Keine Messung

Die Bindungsaffinitäten im Thermophorese-Assay sind als K_D, Stabilisierungen in Änderung des Schmelzpunktes (ΔT in °C) angegeben. Die Werte, die aufgrund des Ausfalls des Gerätes nicht zeitnah erhoben werden konnten sind mit „Keine Messung“ vermerkt. Messwerte, die mit „Nicht feststellbar“ aufgeführt sind, bedeuten, dass der Effekt zu gering war, um messbar zu sein.

Bei der Auswertung der Ergebnisse konnte beobachtet werden, dass die Stabilisierungswirkung im *Thermal-Shift*-Assay in direkter Korrelation mit den im MST-Assay bestimmten Bindungskonstanten steht; je besser die Affinität der peptidischen Liganden ist, desto stärker ist der stabilisierende Effekt auf das Protein. Somit bot der TSA zwar keine Möglichkeit für eine quantitative Bestimmung der Bindungsaffinität der peptidischen Liganden, sehr wohl aber für eine qualitative Bestimmung der Bindungsaffinitäten auf.

Er konnte somit als Assay zur Voreinteilung der Liganden nach erwarteter Affinität bereits vor Bestimmung der Bindungsaffinität verwendet werden („*Pre-Screening-Assay*“). Aufgrund des Ausfalls des Gerätes zum Ende der Arbeit konnten jedoch leider nicht alle Liganden im TSA vermessen werden. Die Diskussion der Messwerte ist im Folgenden zu finden, während die strukturbasierte Diskussion in Kapitel 6 zu finden ist.

4.1.2 Diskussion der Messwerte für PKI⁵⁻²⁴

Es zeigte sich, dass die Affinität des literaturbekannten PKI⁵⁻²⁴, die in der Literatur bei einer ATP-Konzentration von $8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ mit $2,3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ angegeben ist^[21], im Thermophorese-Assay unter Zugabe von ATP mit einem höheren Wert von $144,0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ bestimmt wurde. Obwohl der Unterschied um den Faktor 60 auf den ersten Blick sehr hoch erscheint, ist er vermutlich auf prinzipielle Unterschiede in den benutzten Messmethoden zurückzuführen. In der Literatur wurde die Affinität mithilfe eines Phosphorylierungsassays bestimmt^[21], während im Rahmen dieser Arbeit ein Thermophorese-Assay verwendet wurde. Unabhängig von den verwendeten Puffern und Messbedingungen, die bereits einen solchen Unterschied verursachen könnten, ist zu bedenken, dass bei einem Phosphorylierungsassay nur die Inhibitionskonstante K_I bestimmt werden kann, da nicht die direkte Bindung an das Protein, sondern der Einfluss des Liganden auf die Phosphorylierung eines kleinen Substrates beobachtet wird. Im Thermophorese-Assay dagegen wird direkt die Bindung des Liganden ohne Effekt auf die katalytische Wirkung der Kinase bestimmt und somit die Bindungskonstante K_D ermittelt. Da die Affinität in Phosphorylierungsassay und Thermophorese-Assay trotz des großen Unterschiedlichkeit der Methoden in einem ähnlichen Bereich liegt, kann davon ausgegangen werden, dass der Thermophorese-Assay für die Bestimmung der Affinität von peptidischen Liganden geeignet ist und mit den Literaturangaben gut in Einklang steht. Ohne die Zugabe von ATP konnte im MST-Assay keine Affinität nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die Affinität ohne ATP in einen Bereich von $> 500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sinkt, die unter den Messbedingungen nicht mehr nachgewiesen werden können. Eine Affinitätsbestimmung mit einer deutlich höheren Startkonzentration an Ligand könnte diese Affinität vermutlich nachweisen. Eine Messung mit diesen höheren Konzentrationen wurde allerdings nicht durchgeführt, da große Mengen an peptidischen Liganden nicht mit vertretbarem Aufwand synthetisierbar waren und nur im niedrigen Milligramm-Maßstab erhalten werden konnten.

Die nicht feststellbare Affinität im MST-Assay könnte ebenfalls bedeuten, dass das Peptid nicht ohne Zugabe von ATP mit hoher Affinität an die Proteinkinase A bindet. Eine zu gewissem Maß ausreichende Affinität muss allerdings gegeben sein, da in der Literatur bereits Kristallstrukturen bekannt sind, in denen PKI⁵⁻²⁴ ohne die Zugabe von ATP gebunden ist (PDB-Code 2GFC).

Die Ergebnisse im *Thermal-Shift*-Assay sind in direkter Korrelation mit den im MST-Assay bestimmten Bindungskonstanten. PKI⁵⁻²⁴ weist unter Zugabe von ATP die höchste Affinität der vermessenen peptidischen Liganden und den höchsten stabilisierenden Effekt auf das Protein von $6,50 \pm 0,24$ °C auf. Ohne ATP wurde im TSA immer noch ein stabilisierender Effekt von $1,17 \pm 0,24$ °C nachgewiesen, der Hinweis auf eine Bindung des Proteins aufweist.

4.1.3 Diskussion der Messwerte für PKI⁵⁻²²

Bei der Affinitätsbestimmung einer verkürzten Version von PKI⁵⁻²⁴ ohne die terminalen zwei Aminosäuren His²³ und Asp²⁴ entspricht, wurde unter Zugabe von ATP ein Wert von $4,32 \pm 0,89$ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ gemessen. Es tritt somit eine Verschlechterung der Affinität um den Faktor 30 bei Verkürzung von zwei Aminosäuren auf. Hierfür könnte der Verlust von positiven Interaktionen der Aminosäuren His²³ und Asp²⁴ in PKI⁵⁻²⁴ verantwortlich sein, dies musste jedoch mittels kristallographischer Methoden verifiziert werden. In Abwesenheit von ATP konnte auch bei dieser verkürzten Variante keine Affinität nachgewiesen werden, was in guter Korrelation zu den bestimmten Affinitäten von PKI⁵⁻²⁴ steht. Ebenfalls wurde ein verminderter stabilisierender Effekt von $3,50 \pm 0,00$ °C mit ATP und $0,50 \pm 0,29$ °C ohne ATP gemessen. Die Messwerte von TSA und MST-Assay sind somit erneut in guter Korrelation; eine geringere Affinität wird von einem niedrigeren stabilisierenden Effekt begleitet.

4.1.4 Diskussion der Messwerte für PKI(RBS¹³)⁵⁻²²

PKI(RBS¹³)⁵⁻²² war der erste peptidische Ligand, bei dem eine Ribo-Aminosäure in die Sequenz eingeführt wurde. Dabei wurde das im nativen PKI⁵⁻²² an Position 13 vorliegende Serin gegen ein Riboserin ausgetauscht. Bei der Affinitätsbestimmung dieser neuen Art von peptidischem Ligand wurde unter Zugabe von ATP ein Wert von $2,67 \pm 0,35$ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ gemessen. Diese Affinität ist um den Faktor 2 besser als die Affinität von PKI⁵⁻²².

Unter Vergleich der Standardabweichungen der gemessenen Affinitäten zeigte sich jedoch, dass diese Verbesserung nur eine statistische Abweichung und keine wirkliche Verbesserung im Gegensatz zur nativen Sequenz bedeuten könnte.

Wichtig hierbei war, dass keine Verschlechterung der Affinität bei Einführung einer Ribo-Aminosäure auftrat, da dies zeigte, dass eine solche Variation gut in der Interaktion zwischen Protein und Peptid toleriert wird. Die Einführung von Ribo-Aminosäuren in peptidische Liganden schließt diese als Substrate für die PKA nicht von vornherein aus.

Ohne die Zugabe von ATP konnte wie bei dem nativen PKI⁵⁻²² keine Bindung detektiert werden. Im TSA wurde für PKI(RBS¹³)⁵⁻²² ohne die Zugabe von ATP ein Wert von $0,17 \pm 0,29$ °C und bei Zugabe von ATP von $2,50 \pm 0,29$ °C ermittelt. Der stabilisierende Effekt ohne die Zugabe von ATP fällt hierbei in einem nicht signifikanten Bereich und lässt sich nicht von statistischer Fehlerschwankung trennen. Der stabilisierende Effekt mit und ohne ATP fällt in den gleichen Bereich wie für die Bindung von PKI⁵⁻²². Sämtliche Messwerte deuten somit auf ein ähnliches Verhalten von PKI(RBS¹³)⁵⁻²² wie von PKI⁵⁻²² hin.

4.1.5 Diskussion der Messwerte für PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²

Bei diesem variierten Peptid wurde das im PKI⁵⁻²² an Position 18 vorliegende Arginin gegen ein Riboserin ausgetauscht. Im Thermophorese-Assay und *Thermal-Shift*-Assay konnte weder ein stabilisierender Effekt, noch eine Bindung detektiert werden. Dies war unabhängig von der gleichzeitigen Zugabe von ATP. Zur Beurteilung, ob die Einführung des Riboserins als solches oder die Position der variierten Aminosäure zum Verlust der Affinität führte, wurde eine Literaturrecherche durchgeführt. In der Literatur wurde berichtet, dass der Austausch eines der drei in PKI⁵⁻²² enthaltenen Arginine gegen die Aminosäure Glycin, insbesondere der Arginine an Position 18 und 19, zu einem hohen Verlust an Bindungsaffinität führt.^[22] Somit bestätigen unsere Messwerte die beschriebene Korrelation in der Literatur. Da PKI(RBS¹³)⁵⁻²² immer noch eine gute Affinität aufwies, wurde vermutet, dass der Verlust der Affinität von PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² auf die Variation an Position 18 und nicht auf die Einführung eines Riboserins resultiert.

4.1.6 Diskussion der Messwerte für PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²

Bei diesem modifizierten Peptid wurde das im nativen PKI⁵⁻²² an Position 20 vorliegende Asparagin gegen ein Riboserin ausgetauscht. Interessanterweise war diese Variation einer der wenigen peptidischen Liganden, deren Bindungsaffinität ohne Zugabe von ATP besser war als mit Zugabe von ATP. Ohne ATP konnte eine Affinität von $6,20 \pm 5,00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ gemessen werden, die bei Zugabe von ATP auf $29,60 \pm 10,00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ absank.

Die Ergebnisse des TSA zeigten ohne ATP einen stabilisierenden Effekt von $1,00 \pm 0,00 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und mit ATP von $2,33 \pm 0,29 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Obwohl die Affinität ohne Zugabe von ATP besser war als nach Zugabe von ATP, wurde ein größerer stabilisierender Effekt nach Zugabe von ATP gemessen. Beim Vergleich mit anderen Liganden der Serie wurde deutlich, dass der stabilisierende Effekt nach Zugabe von ATP mit der Bindungsaffinität nach Zugabe von ATP korreliert war und auch bei PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² die Bindungsaffinität im niedrigem $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ -Bereich durch den stabilisierenden Effekt im TSA vorhergesagt werden konnte. Beim Vergleich der Bindungsaffinitäten und stabilisierenden Effekte ohne ATP zeigte sich, dass nur wenige Peptide überhaupt einen stabilisierenden Effekt aufwiesen, der ein signifikantes Ausmaß erreichte. Interessanterweise handelte es sich um genau die Peptide, die auch ohne ATP eine Bindungsaffinität im messbaren Bereich aufwiesen. Bei der einzigen Ausnahme dieser Regel handelte es sich um PKI⁵⁻²⁴. Da dieses Peptid jedoch zwei Aminosäuren mehr enthält, ist eine direkte Vergleichbarkeit nicht unbedingt gegeben. Somit zeigte sich, dass die Vergleichbarkeit zwischen den stabilisierenden Effekten im TSA und der Bindungsaffinität aus den MST-Messungen nur innerhalb einer sehr engen Reihe gleicher Bedingungen, d.h. ohne Zugabe von ATP oder mit Zugabe von ATP eine gewisse Korrelation ergibt. Der absolute Vergleich bei größerer Strukturvariation ist nicht möglich. Bei Auftreten eines stabilisierenden Effektes ohne ATP kann dennoch eine nachweisbare Bindungsaffinität möglich sein.

PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² war einer der Liganden, deren Verknüpfung zur ATP-Bindestelle über eine Interaktion mit dem β - oder γ -Phosphat von ADP oder ATP stattfinden sollte. Eine mögliche Erklärung des Verlustes an Affinität bei der Zugabe von ATP wäre eine sterische Repulsion zwischen dem γ -Phosphat des ATPs und dem Riboserin des peptidischen Liganden.

Ebenfalls sollte untersucht werden, welche neuen, vorteilhaften Interaktionen PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² im Gegensatz zu PKI⁵⁻²² eingeht, die eine messbare Affinität selbst ohne Zugabe von ATP erlauben.

4.1.7 Diskussion der Messwerte für PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²

Bei diesem variierten Peptid wurde das im nativen PKI⁵⁻²² an Position 16 vorliegende Threonin gegen ein Ribothreonin ausgetauscht. Ohne die Zugabe von ATP konnte nur ein nicht signifikanter stabilisierender Effekt von $0,67 \pm 0,00$ °C und mit MST keine Bindungsaffinität gemessen werden.

Bei der Zugabe von ATP konnte ein stabilisierender Effekt von $1,83 \pm 0,29$ °C und eine Bindungsaffinität von $26,00 \pm 4,65$ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ gemessen werden. Die Einführung des Ribothreonins sorgte für keine Verbesserung der Bindungseigenschaften des Peptides. Jedoch trat ebenfalls keine extreme Verschlechterung der Bindungseigenschaften auf. Dies zeigte, dass die Einführung eines Ribothreonins in die peptidischen Liganden grundsätzlich toleriert wird. Eine mögliche Erklärung der schwachen Einbuße in der Bindungsaffinität könnte die Größe des Ribothreonins in Gegensatz zum Threonin sein, da sterische Konflikte mit der Bindetasche auftreten könnten.

4.1.8 Diskussion der Messwerte für PKI(RBS¹⁹)⁵⁻²²

Wie bereits bei PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²², handelt es sich bei PKI(RBS¹⁹)⁵⁻²² um eine Variante, bei der eines der für die Affinität von PKI⁵⁻²² essentiellen Arginine, in diesem Fall Arginin¹⁹, durch ein Riboserin ersetzt wurde.^[22] Auch in diesem Fall konnten unabhängig von der Zugabe von ATP weder eine Bindungsaffinität, noch stabilisierende Effekte nachgewiesen werden. Dies bestätigte erneut die in der Literatur beschriebene Abhängigkeit der Bindungsaffinität des PKIs⁵⁻²² von dem Vorliegen der im Wildtyp enthaltenen Argininen.^[22]

4.1.9 Diskussion der Messwerte für PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²²

Bei diesem Peptid war das in PKI⁵⁻²² an Position 17 vorliegende Glycin gegen ein Riboserin ausgetauscht. Im MST konnte nach der Zugabe von ATP eine Bindungsaffinität von $93,98 \pm 82,59$ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ gemessen werden. Ohne die Zugabe von ATP konnte, wie bei PKI⁵⁻²², keine Bindungsaffinität festgestellt werden.

Die im Vergleich zu PKI⁵⁻²² um den Faktor 20 reduzierte Affinität bei Zugabe von ATP könnte gegebenenfalls durch die große Nähe zum an Position 18 vorliegenden Arginin erklärt werden. Dieses Arginin ist essentiell für die Affinität, wie bereits an mehreren Varianten beobachtet wurde, und aus der Literatur bekannt ist.^[22] Die Einführung einer sterisch deutlich anspruchsvolleren Gruppe als Glycin, in diesem Fall einem Riboserin, könnte ebenfalls einen Einfluss auf das Arginin ausüben und dadurch die Interaktion mit ATP erschweren.

4.1.10 Diskussion der Messwerte für PKI(RBS²¹)⁵⁻²²

Diese Variante, bei der Ala²¹ von PKI⁵⁻²² gegen ein Riboserin ausgetauscht wurde, zeigte interessanterweise wie bereits PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² eine bessere Bindungsaffinität ohne die Zugabe von ATP, als mit der Zugabe von ATP. Ohne Präsenz von ATP wurde eine Bindungsaffinität von $21,86 \pm 8,04 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ gemessen, während unter Zugabe von ATP keine Bindungsaffinität bestimmt werden konnte. Wie bereits bei PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² lag die variierte Aminosäure im C-terminalen Bereich des Peptids, das bei Bindung von ATP eine Interaktion mit dem γ -Phosphat eingeht. Eine mögliche Erklärung der fehlenden Bindungsaffinität von PKI(RBS²¹)⁵⁻²² unter Zugabe von ATP könnte, wie bei PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² vermutet, auf einen Konflikt zwischen dem sterisch anspruchsvollen Riboserin im Peptid und dem γ -Phosphat von ATP zurückgeführt werden.

4.1.11 Diskussion der Messwerte für PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²²

Bei dieser Variante wurde das in PKI⁵⁻²² an Position 18 befindliche Arginin gegen eine Boronsäure-haltige Aminosäure (BAR) ausgetauscht. Die in BAR enthaltene Boronsäure sollte eine Verknüpfung mit der in den Adenosinphosphaten AMP, ADP und ATP vorliegenden Ribose eingehen können und gegebenenfalls die Liganden in beiden Bindetaschen miteinander verknüpfen. Es konnte jedoch weder mit noch ohne die Zugabe von ATP eine Bindungsaffinität dieses gemessen werden. Dies zeigte bereits ohne weitere kristallographische Strukturaufklärung, dass zwischen ATP und PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² höchstwahrscheinlich keine günstige Verknüpfung stattfindet, die als Resultat einen in die Bindetasche der PKA bindenden Komplex liefert. Ebenfalls zeigte sich, dass die Einführung der BAR-Aminosäure an Position 18 zum Verlust der Affinität führt. Da in der Literatur bekannt ist, dass Variationen an dieser Position zum Verlust der Affinität führen, wurde davon ausgegangen, dass nicht die Einführung der BAR-Aminosäure als solches, sondern nur die Positionierung der modifizierten Aminosäure für die schlechte Affinität verantwortlich ist.

4.1.12 Fazit zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten und stabilisierenden Effekte von peptidischen Liganden mit Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Bindungsaffinitäten und stabilisierenden Effekte von den peptidischen Liganden PKI⁵⁻²⁴ und der verkürzten Form PKI⁵⁻²² sowie von acht modifizierten peptidischen Liganden mit Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren bestimmt werden. Die Affinität des literaturbekannten PKI⁵⁻²⁴, die mit den neu etablierten Assaymethoden bestimmt wurde, lag in einem vergleichbaren Bereich wie in der Literatur beschrieben.

Somit wurden die in den neu etablierten Assays gemessenen Affinitäten als vergleichbar mit den Daten in der Literatur beurteilt.^[21] Es konnte beobachtet werden, dass der Austausch der beiden Arginine in Position 18 und 19 zum vollständigen Verlust der Affinität und möglicherweise bestehender stabilisierender Effekte führten. Dies steht in Einklang mit in der Literatur beschriebenen Affinitätsbestimmungen aus einem Phosphorylierungsassay.^[22] Variationen, die in der Nähe dieser Arginine stattfanden, resultierten in einen Verlust an Affinität, der umso stärker ausfiel, je näher die Variation an der Position der Arginine stattfand. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Einführung von Riboserinen an Position 20 und 21 zu einem Verlust an Affinität in Anwesenheit von ATP, aber einem Gewinn an Affinität in Abwesenheit von ATP führte. Ebenfalls konnte die angestrebte Verknüpfung eines Peptids mit einer Boronsäure-Aminosäure an Position 18 mit der Ribose des in der Struktur benachbarten ATPs bereits durch das Ausbleiben einer Bindung in Assays mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

4.2 Peptidische Liganden mit Adamantyl-Aminosäuren

4.2.1. Gemessene Affinitäten und Stabilisierungseffekte

In den Assays konnten die in Tabelle 7 gezeigten Ergebnisse für neuartige Peptide mit Adamantyl-Aminosäuren erhalten werden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Messwerte wurden die Ergebnisse für PKI⁵⁻²⁴ und PKI⁵⁻²² erneut in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: In den *Thermal-Shift* und Thermophorese-Assays gemessene Bindungsaffinitäten und Stabilisierungseffekte.

Peptid	K _D aus MST bei 0 mmol · L ⁻¹ ATP	ΔT aus TSA bei 0 mmol · L ⁻¹ ATP, 50 μmol · L ⁻¹ Peptid	K _D aus MST bei 5 mmol · L ⁻¹ ATP	ΔT aus TSA bei 5 mmol · L ⁻¹ ATP, 20 μmol · L ⁻¹ Peptid
PKI ⁵⁻²⁴	Nicht feststellbar	1,17±0,24 °C	144,00±30,00 nmol · L ⁻¹	6,50 ±0,24 °C
PKI ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	0,50±0,29 °C	4,32±0,89 μmol · L ⁻¹	3,50 ±0,00 °C
PKI((S)-SC1 ⁷) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	Keine Messung	3,14±0,88 μmol · L ⁻¹	Keine Messung
PKI(BB1 ^{15,16}) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	Keine Messung	50,04±8,30 μmol · L ⁻¹	Keine Messung
PKI((S)-SC2 ¹¹) ⁵⁻²²	1,16±0,40 μmol · L ⁻¹	Keine Messung	657,00±143,00 nmol · L ⁻¹	Keine Messung
PKI((S)-SC1 ⁶) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	Keine Messung	Nicht feststellbar	Keine Messung

Die Bindungsaffinitäten im Thermophorese-Assay sind als K_D, Stabilisierungen in Änderung des Schmelzpunktes (ΔT in °C) angegeben. Die Werte, die aufgrund des Ausfalls des Gerätes nicht zeitnah erhoben werden konnten sind mit „Keine Messung“ vermerkt. Messwerte, die mit „Nicht feststellbar“ aufgeführt sind, bedeuten, dass der Effekt zu gering war, um messbar zu sein.

Aufgrund des Ausfalls des TSA-Gerätes zum Ende der Arbeit konnte keines der Adamantyl-Peptide im Rahmen dieser Arbeit vermessen werden. Die Diskussion der Messwerte ist im Folgenden zu finden, während die strukturbasierte Diskussion in Kapitel 6 zu finden ist.

4.2.2 Diskussion der Messwerte für PKI((S)-SC1⁷)⁵⁻²²

In diesem variierten Peptid wurde das in PKI⁵⁻²² an Position 7 befindliche Tyrosin gegen das S-Enantiomer der Adamantyl-Aminosäure SC1 (siehe Abbildung 16) ausgetauscht. Ohne Zugabe von ATP konnte keine Bindungsaffinität gemessen werden. Bei Zugabe von ATP wurde eine Bindungsaffinität von 3,14±0,88 μmol · L⁻¹ bestimmt. Es zeigte sich, dass der Austausch des Tyrosin⁷ in PKI⁵⁻²² weder zu einer Änderung des Bindungsverhaltens in Abhängigkeit von ATP, noch zu einer Änderung der Bindungsaffinität führte; die geringfügig bessere Bindungsaffinität von PKI PKI((S)-SC1⁷)⁵⁻²² im Gegensatz zu PKI⁵⁻²² liegt im Bereich der statistischen Schwankung des Assays.

Der Austausch einer sterisch anspruchsvollen Aminosäure wie Tyrosin gegen die Adamantyl-Aminosäure wird offensichtlich gut toleriert. Die Assaybestimmung dieser Peptid-Variante zeigte jedoch bereits im Vorfeld, dass die Einführung von Adamantyl-Aminosäuren in peptidische Liganden diese nicht als Substrate für die Proteinkinase A disqualifiziert.

4.2.3 Diskussion der Messwerte für PKI(BB1^{15,16})⁵⁻²²

Im Gegensatz zu allen anderen peptidischen Variationen, die im Rahmen dieser Arbeit vermessen wurden, wurde in PKI(BB1^{15,16})⁵⁻²² mehr als eine Aminosäure in der Sequenz von PKI⁵⁻²² variiert. Die Aminosäuren Arg¹⁵ und Thr¹⁶ wurden gegen eine einzelne BB1-Aminosäure (siehe Abbildung 16) ausgetauscht. Diese neue Adamantyl-Aminosäure konnte somit den Platz von zwei Aminosäuren einnehmen, als γ -Aminosäure ist sie in der Lage den Bereich zweier Aminosäuren zu überspannen. Diese extrem starre Verbrückung führt zu einer Veränderung der Bindungseigenschaften des Peptids. Die beobachtete Affinität in Anwesenheit von ATP im Gegensatz zum nativen PKI⁵⁻²² weist eine Verschlechterung um den Faktor 10 auf $50,04 \pm 8,30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die relative Nähe zu den Argininen 17 und 18 wie bereits bei der Serie der Ribo-Aminosäuren angedeutet, zu einem Verlust an Bindungsaffinität führen sollte. Sowohl die Ausbildung neuer Interaktionen aber auch der Verlust an bereits bestehenden Interaktionen, vor allem der Einfluss der Argininreste 17 und 18 muss als mögliche Erklärung für die reduzierte Bindungsaffinität erwägt werden.

In Abwesenheit von ATP konnte, wie bereits beim nativen PKI⁵⁻²², keine Bindungsaffinität gemessen werden.

4.2.4 Diskussion der Messwerte für PKI((S)-SC2¹¹)⁵⁻²²

Die Variation PKI((S)-SC2¹¹)⁵⁻²² war die einzige der im Rahmen dieser Arbeit getesteten peptidischen Liganden, bei der eine hydrophobe Aminosäure (Ile¹¹ in PKI⁵⁻²²) gegen eine Adamantyl-Aminosäure ausgetauscht wurde. Interessanterweise konnte für dieses Peptid eine signifikant verbesserte Bindungsaffinität von $1,16 \pm 0,40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in Abwesenheit von ATP und $657,00 \pm 143,00 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ in Anwesenheit von ATP gemessen werden.

Im Gegensatz zu der Serie der Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren, bei der nur dann eine Affinität ohne ATP festgestellt werden konnte, wenn die Variation im C-terminalen Bereich des Peptides durchgeführt wurde, befand sich der Austausch von Ile¹¹ gegen (S)-SC2¹¹ eher in Richtung des N-Terminus, wo das Peptid helicale Struktur annimmt. Ebenfalls wurde für das Peptid nach Einführung der Adamantyl-Aminosäure eine bessere Bindungsaffinität in Anwesenheit von ATP im Vergleich zur Abwesenheit von ATP gemessen werden.

Bei der Variation mit Ribo-Aminosäuren, die ohne ATP eine Affinität aufwiesen, wurden stets bessere Affinitäten ohne Zugabe von ATP als mit Zugabe von ATP gemessen. Dies spricht dafür, dass bei den Ribo-Aminosäuren neue Interaktionen eingeführt werden, die in Konflikt mit ATP in der Bindetasche der PKA stehen und nur ohne gebundenes ATP eine vorteilhafte Wechselwirkung ausüben können. Bei der eingeführten Adamantyl-Aminosäure kommt es dagegen nur zu einer insgesamt verbesserten Affinität, so dass die Bindungsaffinität des Peptides selbst ohne ATP messbar ist. Es wurden möglicherweise keine zusätzlichen Interaktionen eingeführt, sondern nur bereits vorhandene Interaktionen, wie hydrophobe Kontakte optimiert oder die Bindungsaffinität profitiert von einer Reduktion der Anzahl an Freiheitsgraden und einer verbesserten Präorganisation des Liganden. Eine Verbesserung von peptidischen Liganden durch die Einführung von Adamantyl-Aminosäuren ist somit durchaus möglich und das vorgeschlagene Konzept konnte mithilfe des Peptides PKI((S)-SC2¹¹)⁵⁻²² bestätigt werden.

4.2.5 Diskussion der Messwerte für PKI((S)-SC1⁶)⁵⁻²²

In dieser Variation wurde das in PKI⁵⁻²² an Position 6 befindliche Threonin gegen das S-Enantiomer der Adamantyl-Aminosäure SC1 (siehe Abbildung 16) ausgetauscht. Weder mit noch ohne Zugabe von ATP konnte eine Bindungsaffinität gegen die Kinase beobachtet werden. Es wäre denkbar, dass durch die Einführung der sterisch anspruchsvollen und stark hydrophoben Adamantyl-Aminosäure die polaren Interaktionen der Hydroxygruppe des Wildtyp-Threonins verloren gingen und möglicherweise sterische Konflikte innerhalb der Bindetasche auftreten.

4.2.6 Fazit zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten und stabilisierenden Effekte von peptidischen Liganden mit Adamantyl-Aminosäuren

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Bindungsaffinitäten und stabilisierenden Effekte von vier modifizierten peptidischen Liganden mit Adamantyl-Aminosäuren bestimmt werden. Es konnte beobachtet werden, dass die Einführung von Adamantyl-Aminosäuren durch eine Optimierung der im Peptid vorhandenen Interaktionen vorteilhaft für die Bindungsaffinität sein konnte. Der Austausch von polaren Aminosäuren wie Threonin oder Tyrosin gegen Adamantyl-Aminosäuren kann jedoch auch zu einem Verlust von Affinität führen. Dabei ist die Position der Variation entscheidend.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Variationen an benachbarten Positionen getestet; für Position 7 (Tyrosin) trat keine Änderung der Affinität auf, während für Position 6 (Threonin) ein vollständiger Verlust der Bindungsaffinität resultierte.

Mithilfe des Bindungsassays konnte bereits an dieser Stelle das Konzept dieses Projektes bestätigt werden, dass die Einführung von Adamantyl-Aminosäuren in peptidische Ligand nicht nur toleriert wird, sondern im günstigen Fall sogar zu einer Verbesserung der Bindungseigenschaften führen kann.

4.3 Fasudil-Derivate

4.3.1. Gemessene Affinitäten und Stabilisierungseffekte

In den Assays konnten die in Tabelle 8 gezeigten Ergebnisse für Fasudil-Derivate erhalten werden.

Tabelle 8: In den *Thermal-Shift* und Thermophorese-Assays gemessene Bindungsaffinitäten und Stabilisierungseffekte.

Ligand	K _D aus MST	ΔT aus TSA bei 100 μmol · L ⁻¹ Ligand
Fasudil	1,58±1,79 μmol · L ⁻¹	7,83 ±0.00 °C
BFS	5,86±2,75 μmol · L ⁻¹	3,67 ±0.29 °C
BFF	7,61±6,25 μmol · L ⁻¹	3,33 ±0.00 °C

Die Bindungsaffinitäten im Thermophorese-Assay sind als K_D, Stabilisierungen in Änderung des Schmelzpunktes (ΔT in °C) angegeben

Bei der Auswertung der Ergebnisse konnte beobachtet werden, dass die stabilisierende Wirkung im *Thermal-Shift*-Assay in direkter Korrelation mit den im MST-Assay bestimmten Bindungskonstanten steht; je höher die Affinität der Liganden ist, desto stärker wirkt sich deren stabilisierender Effekt auf das Protein aus. Sowohl der MST-Assay, als auch der TSA sind somit für die Bestimmung der Bindungsaffinitäten beziehungsweise der stabilisierenden Effekte von Fasudil-Derivaten geeignet. Die Korrelation der Affinitäten zu den stabilisierenden Effekten gilt jedoch auch hier nur innerhalb einer engen Serie von gleichartigen Liganden. Die Korrelation zwischen den Affinitäten und den stabilisierenden Effekten fällt allerdings bei den Serien von Peptiden unterschiedlich aus zu der vergleichbaren Korrelation bei den Fasudilen. Die Diskussion der Messwerte ist im Folgenden zu finden, während die strukturbasierte Diskussion in Kapitel 6 zu finden ist.

4.3.2 Diskussion der Messwerte für Fasudil

Bei den Messungen konnte für den literaturbekannten Liganden Fasudil eine Bindungsaffinität von $1,58 \pm 1,79 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ bestimmt werden. In der Literatur ist eine Affinität von $286 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ angegeben, die mittels ITC bestimmt wurde.^[35] Die Messwerte im MST-Assay zeigen somit eine leicht schlechtere Affinität, dies ist jedoch den unterschiedlichen Methoden zur Affinitätsbestimmung geschuldet. Da die Affinität aus ITC und MST in einem ähnlichen Bereich liegen, wurde der MST-Assay dennoch als geeignet für die Bestimmung von Bindungsaffinitäten peptidischer Liganden und unter den gleichen Bedingungen für die Bestimmung von Bindungsaffinitäten von Fasudil-Derivaten beurteilt.

4.3.3 Diskussion der Messwerte für BFS

Es zeigte sich, dass die Einführung einer Phenylboronsäure-Gruppe an das sekundäre Amin des Fasudils zu einer Verschlechterung der Affinität um den Faktor 3 führt; BFS weist nur eine Affinität von $5,86 \pm 2,75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf.

Ebenfalls sinkt der stabilisierende Effekt von $7,83 \pm 0,00 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bei Fasudil auf $3,67 \pm 0,29 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bei BFS. Die Korrelation von Bindungsaffinität und stabilisierendem Effekt kann somit ebenfalls beobachtet werden. Da im MST-Assay nur eine Bindungsaffinität bestimmt wird und keine Aussagen über Thermodynamik oder Kinetik der Bindung möglich ist, konnten anhand der Assays keine Hinweise zur Erklärung der veränderten Affinität erhalten werden. Da der an die *hinge*-Region bindende Isochinolin-Ring unverändert bleibt, wurde kein stark veränderter Bindungsmodus vermutet. Die genauen Interaktionen des an die PKA gebundenen BFS, vor allem in der Koordination mit Wassermolekülen in der Bindetasche mussten mittels kristallographischer Strukturaufklärung bestimmt werden.

4.3.4 Diskussion der Messwerte für BFF

Durch die Öffnung des siebengliedrigen 1,4-Homopiperazin-Ringes in BFS und die Überführung beider tertiären Amine in sekundäre Amine wird das Fasudil-Derivat BFF erhalten. Diese Veränderung führte zu einer verschlechterten Bindungsaffinität von $7,61 \pm 6,25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ und einem erniedrigten stabilisierenden Effekt von $3,33 \pm 0,00 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Korrelation von Bindungsaffinität zu stabilisierendem Effekt war auch in diesem Fall gegeben.

4.3.5 Fazit zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten und stabilisierenden Effekte von Fasudil-Derivaten

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Bindungsaffinitäten und stabilisierenden Effekte des literaturbekannten Fasudil, sowie von zwei derivatisierten Fasudilen bestimmt werden. Es zeigte sich, dass die Einführung einer Phenylboronsäure, sowie die Öffnung des siebengliedrigen 1,4-Homopiperazin-Ringes zu einer geringfügigen Verschlechterung der Bindungsaffinität führte. Diese Einbußen fielen jedoch sehr gering aus und zeigten somit, dass die Einführung einer Linker-Gruppe in Fasudil-artige Liganden toleriert wird.

Somit eignet sich Fasudil als geeigneter *hinge*-Binder zur selbstassemblierten Verknüpfung der Peptid- und der ATP-Bindetaschen.

4.4 Adenosinphosphate

4.4.1. Gemessene Affinitäten und Stabilisierungseffekte

Im MST-Assay konnten die in Tabelle 9 gezeigten Bindungsaffinitäten für Adenosinphosphate erhalten werden.

Tabelle 9: Im Thermophorese-Assay gemessene Bindungsaffinitäten als K_D

Adenosinphosphat	K_D aus MST
AMP	Nicht feststellbar
ADP	$42,21 \pm 34,39 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
ATP	$32,94 \pm 22,45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen (siehe Kapitel 5) mussten die Affinitäten der Adenosinphosphate AMP, ADP und ATP, sowie deren (de-)stabilisierenden Effekte bestimmt werden, um die Konzentration zu ermitteln, ab der das Protein vollständig mit ihnen gesättigt vorliegt und bis zu welcher Konzentration das Protein sie tolerieren kann, ohne dass Einbußen in der Stabilität auftreten.

4.4.2 Diskussion der Affinitäten

Für Adenosinmonophosphat (AMP) konnte selbst bei Erhöhung der Startkonzentration des Liganden in den MST-Assays keine Affinität bestimmt werden. Die Bindungsaffinität wurde somit als $>1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ abgeschätzt. Adenosindiphosphat (ADP) wies eine Affinität von $42,21 \pm 34,39 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf; Adenosintriphosphat (ATP) wies eine Affinität von $32,94 \pm 22,45 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf.

In der Literatur wird eine Affinität von $4,2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ für ATP angegeben.^[36] Wie bereits bei der Messung literaturbekannter peptidischer Inhibitoren beschrieben, wurde jedoch zur Bestimmung dieser Affinität eine andere Assay-Methode als die mikroskalierte Thermophorese verwendet. Die Bindungsaffinität von ATP wurde dort mittels Gleichgewichts-Dialyse ermittelt.^[36] Deshalb ist bezüglich der ermittelten Affinitäten nur eine grobe Vergleichbarkeit gegeben. Für die Affinität von ADP wurde ein Wert von $5,34 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ angegeben.^[36]

Die im MST-Assay bestimmten Bindungsaffinitäten sind wie bereits bei den peptidischen Inhibitoren gefunden, geringfügig niedriger schlechter als die in der Literatur angegebenen Werte. Dieser Unterschied um etwa den Faktor 10 wurde als abhängig von der Methode beurteilt, und die im MST gemessenen Ergebnisse wurden als mit der Literatur vergleichbar angesehen.

Da sowohl ATP als auch ADP beide in der Bindetasche der Proteinkinase A gebunden werden, ist ihre ähnliche Affinität nicht verwunderlich. ATP ist hierbei für die katalytische Wirkung der PKA essentiell, während ADP als Reaktionsprodukt nach der Phosphorylierung von peptidischen Substraten in der Bindetasche vorliegt. Da die Adenosinphosphate literaturbekannt sind und viele Kristallstrukturen der PKA in Komplex mit ihnen vorliegen, findet an dieser Stelle keine weitere Diskussion der Affinitäten in Hinblick auf die Strukturunterschiede statt.

4.4.3 Diskussion der (de-)stabilisierenden Effekte

Die (de-)stabilisierenden Effekte der Adenosinphosphate im TSA sind in Abbildung 29 gezeigt.

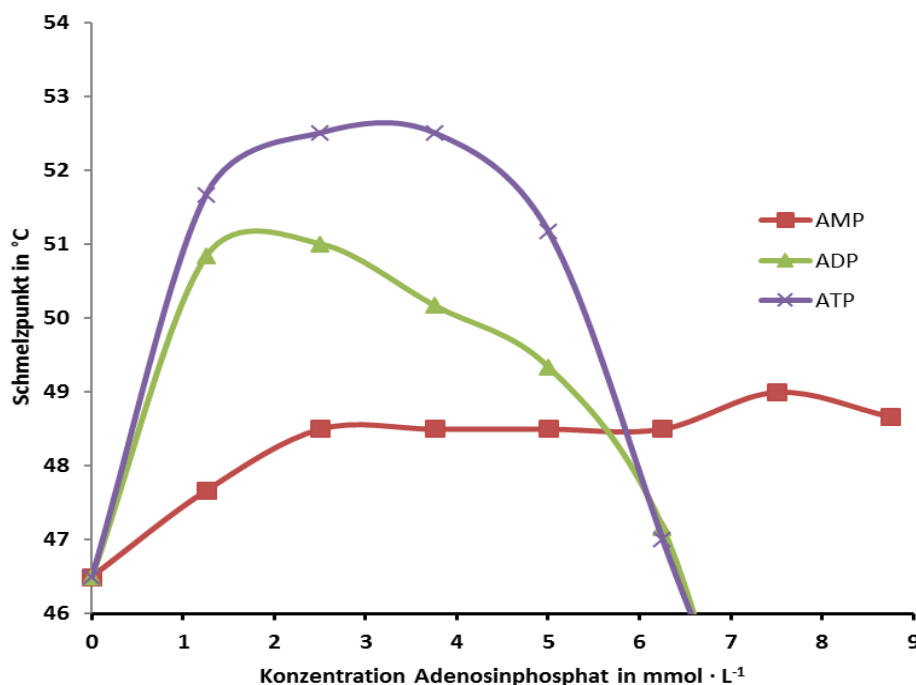


Abbildung 29: Auftragung des Schmelzpunktes der Proteinkinase A in Abhängigkeit der Konzentration von Adenosinphosphaten. Alle Proben enthielten 50 mmol · L⁻¹ HEPES, 100 mmol · L⁻¹ NaCl, 10 mmol · L⁻¹ MgCl₂ und waren bei pH 7,0.

Bei der Untersuchung der Adenosinphosphate im TSA konnte festgestellt werden, dass sowohl ADP als auch ATP in niedriger Konzentration einen stabilisierenden Effekt aufweisen. Dieser tritt bei ATP bis zu einer Konzentration von 4 mmol · L⁻¹ und bei ADP bis zu einer Konzentration von 2,5 mmol · L⁻¹ auf. Bei höheren Konzentrationen sorgen sowohl ADP und ATP für eine starke Destabilisierung, die oberhalb von 5 mmol · L⁻¹ exponentiell zunimmt. Eine Konzentration von 5 mmol · L⁻¹ wurde somit als Obergrenze der Konzentration von ADP und ATP angesehen, bei der das Protein noch ausreichende Stabilität aufweist. Für AMP dagegen tritt offensichtlich weder ein starker Stabilisierungseffekt, noch ein destabilisierender Effekt auf. Dies korreliert mit der deutlich schlechteren Bindungsaffinität, die im MST nachgewiesen werden konnte.

4.4.4 Fazit zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten und stabilisierenden Effekte von Adenosinphosphaten

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Bindungseigenschaften von Adenosinmonophosphat, Adenosindiphosphat und Adenosintriphosphat ermittelt werden. Die dabei erhaltenen Messwerte waren in guter Übereinstimmung mit den bekannten Literaturwerten.^[36]

Dies zeigte, dass der MST-Assay ebenfalls zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten von Adenosinphosphaten geeignet ist. Durch die Messungen im TSA konnte ein sehr ähnliches Bindungsverhalten von ADP und ATP festgestellt werden, während AMP eine deutliche Abweichung aufzeigt. Dies ist in Korrelation mit den im MST erhaltenen Ergebnissen und unterstreicht die gute Übereinstimmung der Ergebnisse der neu etablierten Methoden untereinander und mit der Literatur. Weiterhin konnte für ADP und ATP die Konzentration $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ als geeignet zur Sättigung der PKA unter Erhaltung der Stabilität ermittelt werden.

5. Kristallisation der PKA

5.1 Optimierung der Kristallisationsbedingung in der Serie der Peptide mit Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren mit und ohne Fasudil-Derivate

Zur Strukturaufklärung der verschiedenen Komplexe aus und PKA Liganden mussten kristallographische Methoden angewendet werden. Ausgehend von einer Kristallisationsvorschrift von Dr. BARBARA WIENEN-SCHMIDT^[35], wurde hierbei anfänglich die Methode des hängenden Tropfen (*hanging drop*) verwendet. Dabei wurde ein $3 \mu\text{L}$ -Tropfen der Kristallisationslösung auf das Deckglas einer Kristallisationsplatte gegeben und über einem mit Reservoirlösung befüllten *Well* platziert. Die Zusammensetzung des Kristallisationspuffers ist in Kapitel VIII zu finden.

Im Gegensatz zu den Bedingungen von Dr. BARBARA WIENEN-SCHMIDT^[35] wurde nur die Konzentration von Mes-Bis-Tris im LC-Puffer („*Liquid for Crystallization*“) von $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ erhöht, um die Pufferkapazität für den Einsatz acider Liganden zu steigern. Nach kurzer Zeit wurde aus verfahrenstechnischen Gründen (kostengünstiger, bei 4°C besser zu handhaben) auf die Methode des sitzenden Tropfens (*sitting drop*) umgestiegen.

Die bei der Kristallisation verwendete Reservoirlösung war ein Methanol-Wasser-Gemisch unterschiedlicher Konzentrationen. Durch die Dampfdiffusion von Methanol in den Kristallisationstropfen wird die Bildung von Kristallisationskeimen verursacht.

Je höher die Konzentration an Methanol im Reservoir ist, desto mehr Kristallisationskeime entstehen; es entstehen dann allerdings deutlich mehr Kristalle, die jedoch meist wesentlich kleiner verbleiben. Niedrige Methanolkonzentrationen sorgen dagegen für weniger Keime, die meist zu größeren Kristallen „heranwachsen“. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Konzentrationen 15-20 %_v Methanol/Wasser gewählt, da diese bei den meisten Kristallisationsansätzen zu den besten Ergebnissen führten. Niedrigere Konzentrationen als 15 %_v Methanol/Wasser führten meist zu unzureichender Kristallbildung, während höhere Konzentrationen oftmals zu verwachsenen, nadeligen Kristallen führte, die für Diffraktionsexperimente nicht verwendet werden konnten.

Für die Kristallisation der verschiedenen PKA-Ligand-Komplexe konnte keine einheitliche Dauer des Kristallwachstums gefunden werden.

Manche Kombinationen aus PKA und peptidischen Liganden oder *hinge*-Bindern bildeten über Nacht voll ausgewachsene, morphologisch geeignete Kristalle, während bei anderen Kombinationen erst nach einem Monat Kristallisationskeime entstanden.

Da die ausgewachsenen Kristalle nach etwa drei Monaten Rissbildung aufwiesen und ihre Streufähigkeit verloren, mussten die Kristallplatten engmaschig überwacht werden, um den geeigneten Moment zum Isolieren und Einfrieren der Kristalle für die Diffraktionsexperimente zu finden. Die benötigte Zeit für das Kristallwachstum konnte durch die Erhöhung der Kristallisationstemperatur von 4 °C auf 18 °C nicht verkürzt werden. Bei der höheren Temperatur begann das Protein im Kristallisationstropfen zu denaturieren; Präzipitatbildung und Gelierung des Tropfens trat auf.

Die Konzentration von peptidischen Liganden innerhalb der Kristallisationslösung wurde im Vergleich zu den Bedingungen von Dr. BARBARA WIENEN-SCHMIDT^[35] nicht verändert. Die Konzentration der Fasudil-Derivate wurden dagegen auf 5 mmol · L⁻¹ erhöht, da erste Versuche mit niedrigen Konzentrationen nach der Datensammlung nur schwache, nicht vollständig definierte Elektronendichte der vermutlich nur partiell populierte Liganden aufwiesen.

Weiterhin zeigte sich, dass die Kristallisationseigenschaften stark abhängig von der Protein-Charge waren. An unterschiedlichen Tagen aufgereinigtes Protein zeigte unter den selben Bedingungen unterschiedliche Kristallisationseigenschaften.

Deshalb musste für viele Komplexe mehr als eine Kristallisationsplatte mit den selben Bedingungen, jedoch unterschiedlichen Protein-Chargen angesetzt werden.

5.2 Optimierung der Kristallisationsbedingung in der Serie der Peptide mit Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren mit Adenosinphosphaten

Bei der Kristallisation der PKA mit den Adenosinphosphaten traten Probleme auf, die eine weitere Optimierung erforderten. Zu Beginn wurde versucht, die Kristallisation analog zu der Serie mit Fasudil-Derivaten durchzuführen, jedoch trat bei Adenosinphosphat-Konzentrationen von $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Präzipitation des Proteins auf, weshalb die Konzentration auf $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ reduziert wurde. Die Kristallqualität nahm durch diese Änderung jedoch nicht zu. Zur Optimierung wurde ein neuer LC-Puffer getestet, der $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Magnesiumchlorid und eine verringerte Lithiumchlorid-Konzentration von $55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ enthielt.

Die Zugabe von Magnesiumchlorid sollte hierbei das Protein stabilisieren, da im TSA die Stabilisierung von PKA-ATP-Komplexen durch Magnesiumchlorid beobachtet werden konnte. Die Konzentration von Lithiumchlorid wurde verringert, da die reine Zugabe von Magnesiumchlorid zu einer starken Erhöhung der Ionenstärke der Kristallisationslösung geführt hätte. Mit diesen neuen Pufferbedingungen konnten für die Komplexe mit ADP und AMP selbst bei einer Adenosinphosphat-Konzentration von $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Kristalle erhalten werden. Für Komplexe mit ATP-Konzentrationen von $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ konnten auch unter den neuen Bedingungen keine Kristalle erhalten werden.

Interessanterweise verbesserte die Verwendung des neuen, LC55/10 genannten Puffers ebenfalls die Kristallqualität. Die Kristalle benötigten längere Zeit zum Wachstum, jedoch waren sie deutlich größer (teilweise Kantenlänge von beinahe 1 mm), fester, morphologisch schöner und wiesen deutlich bessere Diffraktionsqualität auf.

Der beste Datensatz im Rahmen dieser Arbeit mit einer Auflösung von $1,24 \text{ \AA}$, wurde unter Verwendung dieser neuen Kristallisationsbedingung erhalten.

5.3 Optimierung der Kristallisationsbedingung in der Serie des fragmentbasierten Designs von Komplexen

Zur Cokristallisation von PKI⁵⁻²⁴ mit Adamantamin wurden die selben Bedingungen wie zur Kristallisation der Ribo-Aminosäuren mit Fasudil-Derivaten gewählt. Die Konzentration des Fragmentes wurde allerdings auf 25 bzw. 100 mmol · L⁻¹ erhöht. Bei der Kristallisation mit 4-Bromphenylboronsäure wurden Konzentrationen von 5 bzw. 28 mmol · L⁻¹ gewählt.

Die Konzentration 28 mmol · L⁻¹ entsprach dabei der maximal löslichen Konzentration des Fragmentes in der Kristallisationslösung; höhere Konzentrationen hätten die Zugabe von Dimethylsulfoxid erfordert.

5.4 Optimierung der Kristallisationsbedingung in der Serie der Peptide mit Adamantyl-Aminosäuren

Zur Kristallisation der Adamantyl-Peptide wurden die selben Bedingungen wie bei der Kristallisation von Ribo-Aminosäure-Peptiden mit Fasudil-Derivaten verwendet. Dabei konnten allerdings keine Kristalle erhalten werden. Die Verwendung höherer und niedrigerer Methanol-Konzentrationen in den Reservoiren führte zu keiner Verbesserung.

Weder die Erhöhung der Temperatur auf 18 °C, noch die Änderung des pH-Wertes im Kristallisationstropfen über die Dampfdiffusion mit Salzsäure oder konzentriertem Ammoniak führte zur Bildung von Kristallen. Die Zugabe von Impfkristallen mittels eines Pferdehaares und die Verwendung eines Mikroseeding-Screens am MarXtal führte ebenfalls zu keiner Kristallbildung. Durch die Zugabe von 5 mmol · L⁻¹ Fasudil bei der Kristallisation, zur Stabilisierung der *hinge*-Region, konnte für eines der Adamantyl-Peptide eine Struktur erhalten werden. Für keines der anderen Peptide konnte ein Kristall erhalten werden.

5.5 Optimierung der Bedingungen für fragile Kristalle

Die Kristalle der Komplexe von PKA mit PKI⁵⁻²² und PKA mit PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² wiesen größtenteils eine sehr geringe mechanische Stabilität auf. Obwohl sie eine optimale Größe und eine gute Morphologie zeigte, war es nicht möglich, sie mit einem *Loop* aus der Kristallisationslösung zu entnehmen. Jede geringste Berührung des Kristalls mit dem *Loop* führte zu starker Rissbildung und somit zu sehr hoher Mosaizität in den Diffraktionsbildern.

Diese Kristalle lieferten keine zufriedenstellenden Datensätze, weshalb Optimierungen vonnöten waren. Zur Erleichterung des „Fischens“ der Kristalle und weitgehender Vermeidung des mechanischen Stress durch den verwendeten *Loop* wurden Kristallplatten mit „Fluorinert“ anstatt „Korasilon“ angesetzt. „Fluorinert“ weist als perfluoriertes Öl eine höhere Dichte als Wasser auf und sorgt somit für einen schwimmenden Kristalltropfen. Die Kristalle wachsen daher an der Grenzfläche zwischen Öl und wässriger Phase. Diese Verringerung des mechanischen Stresses konnte zwar zu einer leichten Verbesserung der Diffraktionsbildes führen, es konnten jedoch trotzdem mit den so gewonnenen Kristallen keine zufriedenstellenden Datensätze erhalten werden.

Anschließend wurde nach einer Vorschrift von Dr. HELENE KÖSTER^[37] eine Quervernetzung der Kristalle mittels Glutardialdehyd versucht. Dabei wurde im Vergleich zu der bekannten Vorschrift die Zeit des Quervernetzens variiert. Nach 30, 60, 90 und 120 Minuten wurden Kristalle entnommen und auf ihre Diffraktionsfähigkeit und Festigkeit untersucht. Bei PKI⁵⁻²² konnten nach 60 Minuten Kristalle mit ausreichender Festigkeit erhalten werden, deren Diffraktionsvermögen ausreichend für die Sammlung eines Datensatzes war. Für PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² wiesen die Kristalle erst nach 120 Minuten eine Festigkeit auf, für die eine reduzierte Mosaizität beim Entnehmen mittels eines *Loops* verursacht wurde. Die Streufähigkeit dieser Kristalle sank dabei jedoch so stark ab, dass die Sammlung eines Datensatzes nicht lohnenswert gewesen wäre.

Für Kristalle der PKA mit PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² konnte durch Ansetzen von vielen Kristallisationsplatten unter Verwendung unterschiedlicher Protein-Chargen nach etwa 20 Versuchen ein Kristall erhalten werden, der einen vernachlässigbaren Anstieg der Mosaizität aufwies und von dem ein zufriedenstellender Datensatz gesammelt werden konnte.

5.6 Optimierung der *Soaking*-Bedingungen

Zu Beginn der Arbeit wurde versucht, mittels Einlegen von Kristallen in Liganden-Lösungen (so genanntes *Soaking*) diese Liganden durch Diffusion in den Kristall einzubringen. Dabei wurde jeweils ein 3 µL Tropfen des Cryo-Puffers vorbereitet, der den Liganden enthielt.

Das *Soaking* von peptidischen Liganden in *apo*-PKA-Kristalle zeigte weder bei sehr geringen Ligandenkonzentrationen ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), noch bei hohen Konzentrationen ($10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) Erfolge. In beiden Fällen wurden die Kristalle innerhalb von Sekunden zerstört, selbst bei vorherigem Quervernetzen mit Glutaraldehyd.

Beim *Soaking* von Adenosinphosphaten zeigten weder hohe Konzentrationen von $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, noch niedrige Konzentrationen von $2,5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Erfolge. Auch bei diesen Liganden wurden die Kristalle innerhalb von Sekunden zerstört, selbst bei vorherigem Quervernetzen.

Beim *Soaking* von Fasudil-Derivaten in *apo*-Kristalle der PKA wurden nur die in Kapitel VIII erwähnten Bedingungen verwendet. Für Fasudil konnte eine Struktur erhalten werden, bei den Liganden BFS und BFF dagegen war die Elektronendichte in den Strukturen nur sehr schlecht definiert, weshalb diese Strukturen verworfen wurden.

Zum Ende der Arbeit konnte keine Optimierungsphase mehr für diese Liganden durchgeführt werden, da die gesamte Menge an Ligand aufgebraucht worden war und sowohl für weitere Synthesen, als auch für die daraufhin erfolgende Sammlung von Datensätzen an Synchrotron-Quellen keine Zeit mehr im Rahmen dieser Arbeit vorhanden war.

5.7 Erhaltene Kristallstrukturen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten 34 strukturell diverse Kristallstrukturen erhalten werden. Die Liste der Kristallstrukturen ist in Tabelle 10 gezeigt. Die Liste aller Datensammlungsstatistiken (siehe Tabelle 29) und die Liste der internen Benennung der Strukturen (siehe Tabelle 27) sind im Anhang zu finden.

Tabelle 10 Liste der erhaltenen Strukturen für Komplexe aus PKA und Liganden.

Peptide	Solo	Fasudil	BFS	BFF	AMP	ADP	ATP
-	6EH0	6EM2	-	-	-	-	-
PKI ⁵⁻²²	6ERV	6ERW	5OL3	5OTG	-	-	-
PKI(RBS ¹³) ⁵⁻²²	5OUA	-	6EGW	-	-	-	-
PKI(RBS ¹⁸) ⁵⁻²²	5NTJ	5NW8	n.d.	n.d.	6EH2	6EM6	n.d.
PKI(RBS ²⁰) ⁵⁻²²	6ERU	5O0E	5O5M	6EH3	6ESA	6EM7	6EMA
PKI(RBT ¹⁶) ⁵⁻²²	n.d.	6EMB	6EMC	-	-	-	-
PKI(RBS ¹⁹) ⁵⁻²²	-	-	-	-	-	-	-
PKI(RBS ¹⁶) ⁵⁻²²	-	6ERS	6EMD	6EME	-	-	-
PKI(RBS ²¹) ⁵⁻²²	-	-	5OT3	5OUC	-	-	-
PKI(BAR ¹⁸) ⁵⁻²²	5OUS	-	6ERT	-	n.d.	-	-
PKI((S)-SC1 ⁶) ⁵⁻²²	-	5OK3	-	-	-	-	-

Solo bezeichnet hierbei die Struktur der PKA nur in Kombination mit dem jeweiligen Peptid. Gegeben ist jeweils der PDB-Code der Strukturen. Strukturen, die aufgrund von Mängeln nicht in der RSCPDDB hinterlegt wurden, sind mit nicht deponiert (n.d.) markiert. Komplexe für die keine Kristallstruktur erhalten werden konnte sind mit „-“ markiert.

Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 30 die Sequenzen der variierten Peptide gezeigt.

PKI⁵⁻²⁴
Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile-**His-Asp**

PKI⁵⁻²²
Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile

PKI(RBS¹³)⁵⁻²²
Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-**RbS**-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile

PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²
Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-**RbS**-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile

PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²
Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-**RbS**-Ala-Ile

PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²
Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-**RbT**-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile

PKI(RBS¹⁹)⁵⁻²²
Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-**RbS**-Asn-Ala-Ile

PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²²
Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-**RbS**-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile

PKI(RBS²¹)⁵⁻²²
Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-**RbS**-Ile

PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²²
Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-**BAR**-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile

Abbildung 30: Sequenz der peptidischen Liganden im 3-Buchstaben-Code. Die Variationen sind rot hinterlegt und die Bezeichnung der Liganden fett hervorgehoben.

Die Strukturen der Ribo- und Boronsäure-haltigen Aminosäuren ist in Abbildung 19, die Strukturen der Adamantyl-Aminosäuren in Abbildung 16 zu finden. Weiterhin ist die Struktur der Fasudil-Derivate in Abbildung 20 zu finden. In der folgenden Diskussion sind in der Stick-Darstellung alle Stickstoffe blau, alle Sauerstoffe rot, alle Schwefel orange und alle Bor rosa gefärbt. In Adenosinphosphaten sind Phosphor ebenfalls orange gefärbt. Die Färbungen der Kohlenstoffe für Peptide sind in den Bildunterschriften benannt, während Kohlenstoffe der Liganden in Stick-Darstellung analog zur PKA in der jeweiligen Struktur gefärbt sind. Gelbe Linien mit schwarzer Beschriftung zeigen Wasserstoffbrückenbindungen inklusive ihrer Länge.

6. Diskussion der Kristallstrukturen

6.1. Ligandeninduzierte Effekte durch Einführung von Peptiden oder *hinge*-Bindern

6.1.1 Durchgeführte Strukturbestimmungen

Zur Beurteilung der Effekte, die die Bindung eines peptidischen Liganden oder eines Liganden der *hinge*-Region auf die Proteinkinase A ausübt, wurde eine *apo*-Struktur der PKA bestimmt. Anschließend wurde Fasudil, ein Ligand der *hinge*-Region in *apo*-Kristalle eindiffundiert. Auch für diesen Komplex konnte eine Struktur bestimmt werden. Für den Komplex aus der PKA mit dem peptidischen Liganden PKI⁵⁻²⁴ sind in der Literatur bereits Strukturen bekannt, sodass für den Vergleich keine zusätzlichen Kristallisationen vorgenommen werden mussten.

6.1.2 Strukturvergleich der *apo*-PKA mit dem PKA-Fasudil-Komplex

In Abbildung 31 ist die *apo*-Struktur der PKA (rot) im Vergleich zu der PKA-Fasudil-Komplex-Struktur (türkis) gezeigt.

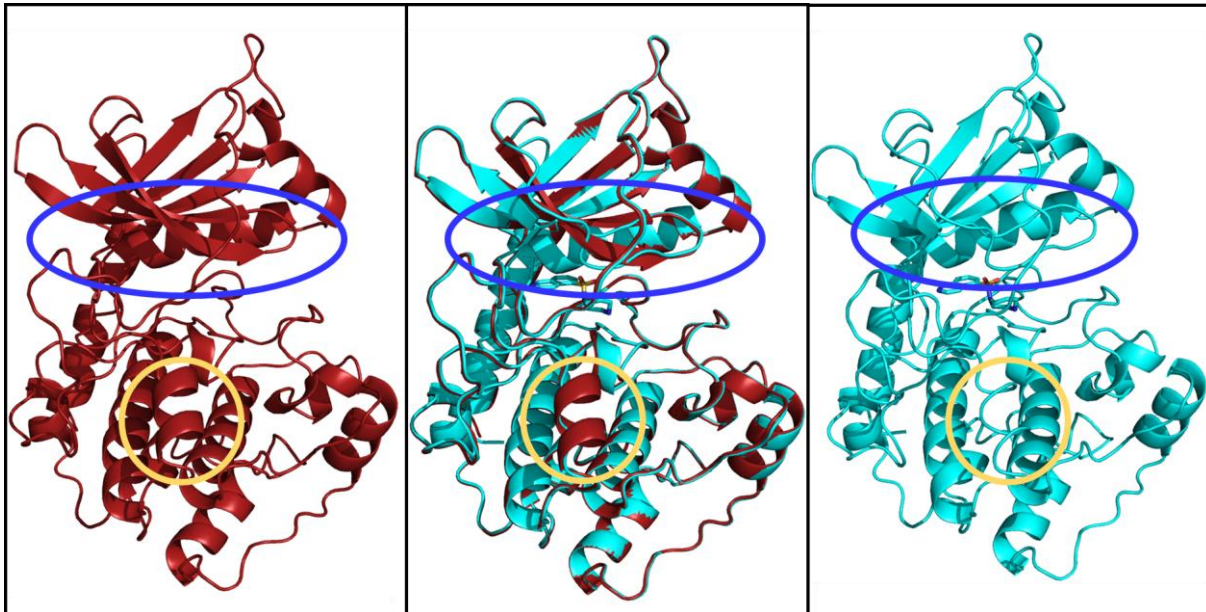


Abbildung 31: Vergleich der *apo*-Struktur der PKA (links, rot, PDB-Code 6EH0) und der Struktur des PKA-Fasudil Komplexes (türkis, rechts, PDB-Code 6EM2). In der Mitte ist die Überlagerung beider Kristallstrukturen gezeigt. Das Protein ist jeweils in der Cartoon-Darstellung, das Fasudil in Stick-Darstellung gezeigt. Hervorgehoben in blau ist der Bereich des β -Faltblattes, der bei Bindung des Fasudils destabilisiert wird. Hervorgehoben in beige ist die α -Helix, die bei Bindung von Fasudil destabilisiert wird.

In der Überlagerung beider Strukturen wird deutlich, dass durch die Bindung von Fasudil in der PKA keine ausgeprägten konformative Änderungen auftreten, beide Strukturen sind größtenteils deckungsgleich. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass ein Teil des β -Faltblattes, das an den Glycin-reichen *Loop* angrenzt, zu einem geringen Teil destabilisiert wird, sodass es weniger stark ausgeprägt ist. Dies wird in der Cartoon-Darstellung deutlich, in der das β -Faltblatt in der PKA-Fasudil-Struktur an dieser Stelle nicht ausgebildet wird. Diese Änderung ist in Abbildung 30 blau hervorgehoben. Weiterhin wird ein kurzer, α -helicaler Bereich bei Bindung von Fasudil destabilisiert, sodass die α -Helix schwach aufgeweitet wird. Auch in diesem Bereich wird in der Cartoon-Darstellung die Änderung deutlich, die α -Helix ist an dieser Stelle nur schwach ausgebildet. Diese Änderung ist in Abbildung 30 beige hervorgehoben. Beide Änderungen sind jedoch nur schwach ausgeprägt und wurden als nicht signifikant genug bewertet, um als ligandeninduzierter Effekt beurteilt zu werden. Werden die Verfeinerungsstatistiken der beiden Strukturen verglichen, so zeigte sich, dass keine Änderung in der Raumgruppe oder den Gitterkoordinaten auftritt.

Der mittlere B-Wert beider Strukturen unterscheidet sich hingegen; der mittlere B-Wert der *apo*-Struktur von 24,31 Å² (21,72 Å² für das Makromolekül) sinkt auf 18,1 Å² (15,83 Å² für das Makromolekül) ab. Es scheint dementsprechend so, als ob Fasudil einen stabilisierenden Effekt auf das Protein ausübt. Dies geschieht durch die Interaktion mit der C- und N-terminalen Domänen verknüpfenden *hinge*-Region und der somit verringerten Schwingung beider Domänen gegeneinander.

6.1.2 Strukturvergleich der *apo*-PKA mit dem PKA-PKI⁵⁻²⁴-Komplex

In Abbildung 32 ist die *apo*-Struktur der PKA (rot) im Vergleich mit der PKA-Fasudil-Komplex-Struktur (blau) gezeigt.

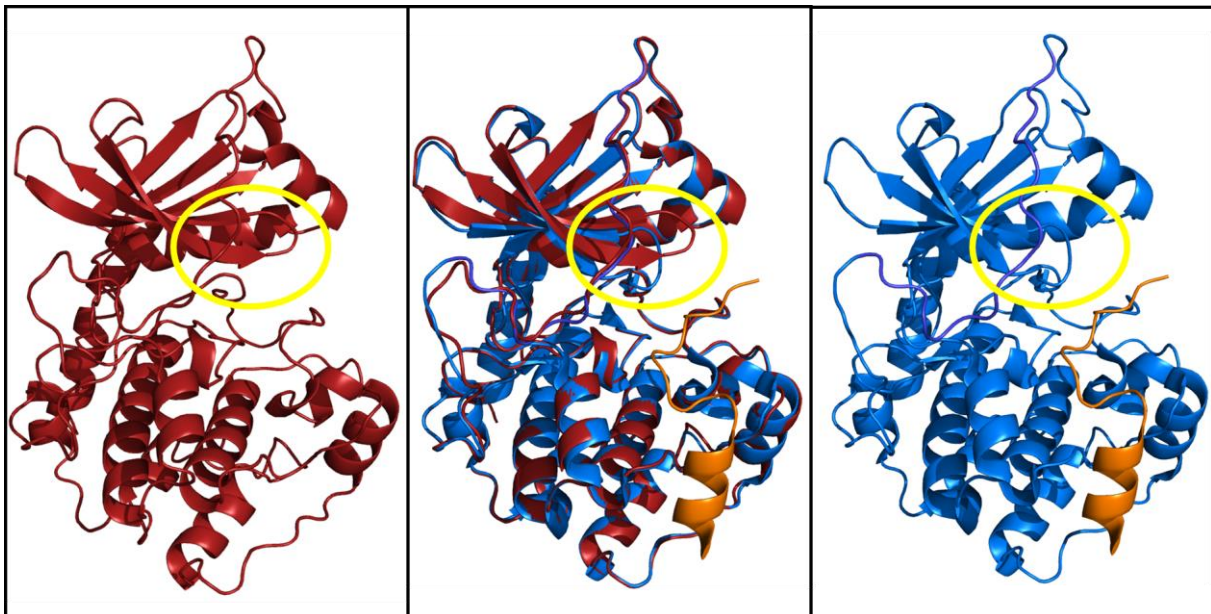


Abbildung 32: Vergleich der *apo*-Struktur der PKA (links, rot, PDB-Code 6EH0) und der Struktur des literaturbekannten PKA-PKI⁵⁻²⁴ Komplexes (blau, rechts, PDB-Code 2GFC). In der Mitte ist die Überlagerung beider Kristallstrukturen gezeigt. Das Protein sowie PKI⁵⁻²⁴ (orange) sind in der Cartoon-Darstellung gezeigt. Hervorgehoben in Gelb ist der Bereich des Glycin-reichen *Loops*, der bei Bindung von PKI⁵⁻²⁴ heruntergezogen wird.

Es zeigte sich, dass bei Bindung des PKI⁵⁻²⁴ eine ausgeprägte konformative Änderung auftritt: Der Glycin-reiche *Loop* wird deutlich in Richtung des Peptides heruntergezogen. Dies geschieht vor allem durch die Interaktion des Arg¹⁸ aus PKI⁵⁻²⁴ mit Thr⁵¹ des Glycin-reichen *Loops*. Das Arginin bildet Wasserstoffbrückenbindungen sowohl mit der Hydroxy-Gruppe des Threonins, als auch mit der im Protein-Rückgrat befindlichen Carbonyl-Gruppe.

Ebenfalls werden Wasserstoffbrückenbindungen zu dem in Richtung des Glycin-reichen *Loops* zeigenden Glu¹²⁷ ausgebildet. In direkter Nachbarschaft von Arg¹⁸ befindet sich Arg¹⁹. Dieses Arginin bildet keine direkten Interaktionen mit dem Glycin-reichen *Loop* aus. Es wird jedoch durch Wasserstoffbrückenbindung an das in der Nähe befindliche Glu¹⁷⁰ fixiert und vereinfacht somit die Ausbildung des Bindungsmodus unter Verwendung von Arg¹⁸. Dieser Bindungsmodus ist in Abbildung 33 gezeigt.

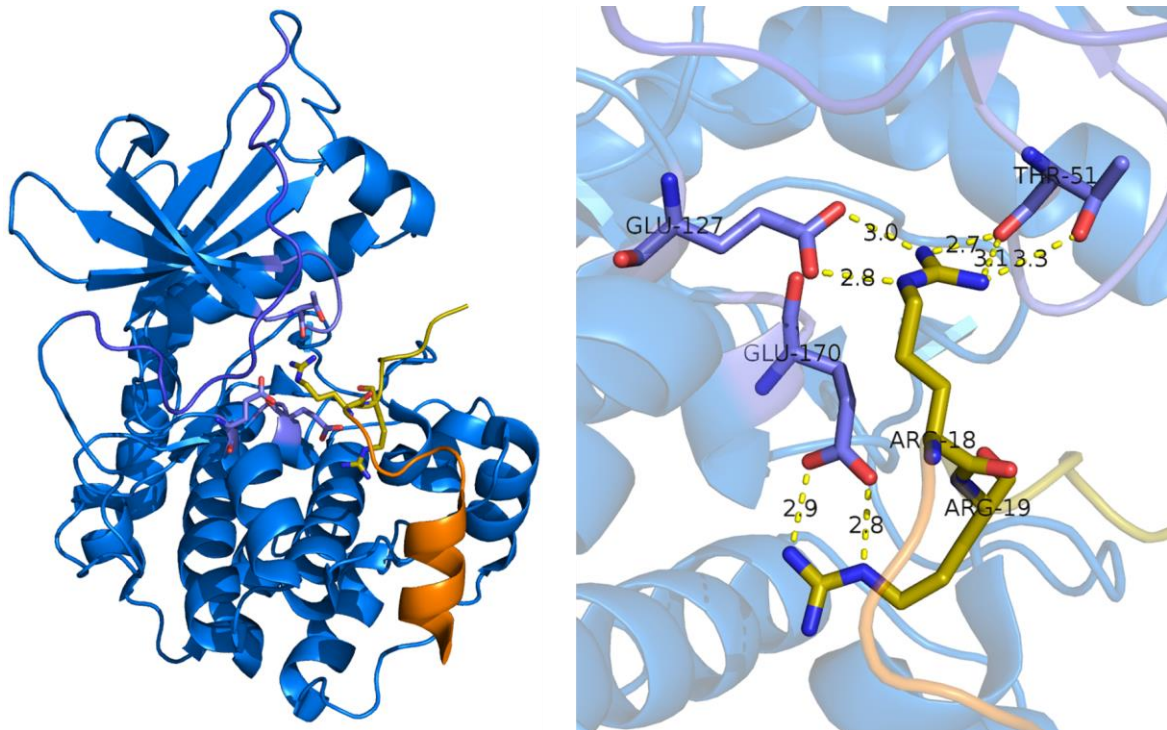


Abbildung 33: Interaktion des Glycin-reichen *Loops* mit PKI⁵⁻²⁴. Links ist die Cartoon-Darstellung der PKA (blau) und von PKI⁵⁻²⁴ (orange) gezeigt. Die in den Interaktionen beteiligten Aminosäuren sind in der Stick-Darstellung gezeigt. Rechts ist eine Ausschnittsvergrößerung der an der Interaktion beteiligten Aminosäuren gezeigt. Kohlenstoffe im Protein sind dunkelblau und Kohlenstoffe im Peptid gold gefärbt. Verwendet wurde hierbei die Struktur des literaturbekannten PKA-PKI⁵⁻²⁴ Komplexes PDB-Code 2GFC).

Neben der Verschiebung des Glycin-reichen *Loops*, wodurch die Bindetasche für *hingebinder* verschlossen wird, kommt es bei der Einführung des Peptides zu einer Änderung in der Einheitszelle. Die Raumgruppe bleibt unverändert bei P2₁2₁2₁, jedoch ändert sich die Einheitszelle von $a = 51,68 \text{ \AA}$, $b = 72,26 \text{ \AA}$, $c = 97,40 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ in der *apo*-Struktur auf $a = 72,49 \text{ \AA}$, $b = 75,53 \text{ \AA}$, $c = 80,39 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ in der PKA-PKI⁵⁻²⁴-Komplex-Struktur. Die Einheitszelle wird somit von einem Volumen von $363,73 \text{ k\AA}^3$ auf $440,15 \text{ k\AA}^3$ aufgeweitet.

Durch die deutlich kleinere Einheitszelle in der *apo*-PKA sind die Proteinmoleküle dichter aneinander gepackt und der Abstand zu den jeweiligen benachbarten Einheitszellen ist geringer. Da das Peptid am Rande der Einheitszelle an der Proteinoberfläche bindet, ist es wenig verwunderlich, dass in *apo*-Kristalle keinerlei Peptide durch *Soaking* eingeführt werden konnten. Beim Eindiffundieren des Peptides wird die Einheitszelle aufgeweitet und durch diese Umlagerung wird die Packung des Kristalles zerstört. Bei der Co-Kristallisation wächst der Kristall von vorneherein in der aufgeweiteten Packung, weshalb mittels dieses Verfahrens PKA-Peptid-Komplexstrukturen erhalten werden konnten.

6.2 Effekt der Verkürzung von PKI⁵⁻²⁴ auf PKI⁵⁻²²

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Variationen des peptidischen Inhibitors verwendet, die im Vergleich mit dem literaturbekannten PKI⁵⁻²⁴ um zwei Aminosäuren verkürzt wurden. Die C-terminalen Aminosäuren Histidin²³ und Asparaginsäure²⁴ wurden entfernt, da die von dem Kooperationspartner Dr. ROMINA KIRSCHNER aus der AG GEYER verwendete Synthesestrategie für Peptide nicht zur Einführung von Histidinen geeignet war. Bevor die Effekte der Variation mittels Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren evaluiert werden konnten, mussten somit zuerst die Effekte der Verkürzung auf die Interaktion zwischen Peptid und PKA bestimmt werden. Da die Einführung von peptidischen Liganden in *apo*-Kristalle der PKA mittels *Soaking* zur vollständigen Zerstörung der Kristalle führte, musste die Struktur des PKA-PKI⁵⁻²²-Komplexes mittels Co-Kristallisation aufgeklärt werden. Die so erhaltenen Kristalle waren jedoch sehr weich, weshalb eine Quervernetzung mittels Glutardialdehyd durchgeführt werden musste. In Abbildung 34 ist ein Vergleich der literaturbekannten PKI⁵⁻²⁴-PKA-Komplex-Struktur (blau) mit der erhaltenen PKI⁵⁻²²-PKA-Komplex-Struktur (hellgrau) gezeigt.

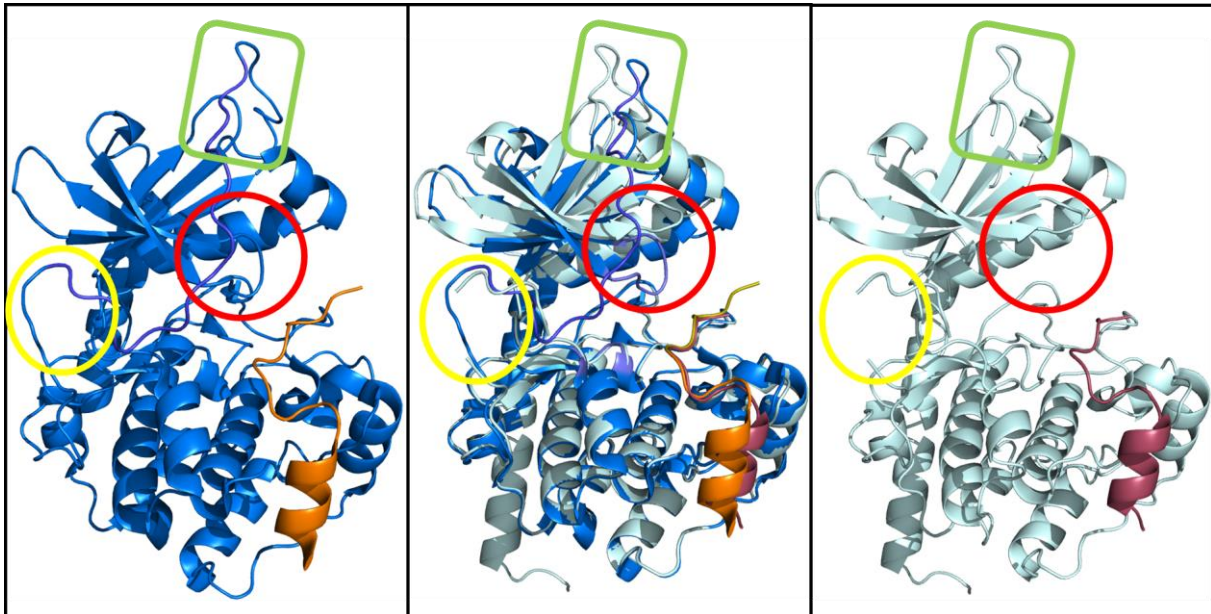


Abbildung 34: Vergleich der literaturbekannten PKI⁵⁻²⁴-PKA-Komplex-Struktur (links, blau, PDB-Code 2GFC) und der Struktur des ermittelten PKA-PKI⁵⁻²² Komplexes (hellgrau, rechts, PDB-Code 6ERV). In der Mitte ist die Überlagerung beider Kristallstrukturen gezeigt. Das Protein sowie PKI⁵⁻²⁴ (orange) und PKI⁵⁻²² (rot) sind in der Cartoon-Darstellung gezeigt. Hervorgehoben in gelb ist der bei Verkürzung des Peptides destabilisierte 320-Loop. Hervorgehoben in grün ist die bei Verkürzung des Peptides verschobene N-terminale Schleife. Hervorgehoben in rot ist der bei Verkürzung des Peptides nach unten verschobene Glycin-reiche Loop.

Es zeigte sich, dass die Verkürzung des Peptides um zwei Aminosäuren einen signifikanten Einfluss auf die PKA ausübt. Wie bereits vorher erwähnt, sorgt die Verkürzung für schlechte Kristallisationseigenschaften; die Kristalle des PKI⁵⁻²²-PKA-Komplexes konnten nur durch Quervernetzung mit Glutardialdehyd ausreichend für die Sammlung eines Datensatzes stabilisiert werden. Selbst mit der Quervernetzung war die Qualität des Datensatzes mit einer Auflösung von 2,06 Å eher schlecht. Innerhalb der Kristallstruktur wurde direkt deutlich, dass der sehr flexible 320-Loop, der sich im Bereich der Aminosäuren 316-330 befindet und besonders im Bereich Gly³²⁰ und Pro³²¹ einen sehr hohen Grad an Fehlordnung aufweist, zu einem großen Teil nicht in die Kristallstruktur eingefügt werden konnte. Die für diesen Bereich erhaltene Elektronendichte war nicht signifikant genug ausgeprägt, um die korrekte Orientierung der Aminosäuren, nicht einmal für deren Atome des Rückgrats, zuzuweisen. Der Beginn dieser fehlgeordneten Region ist in Abbildung 34 gelb hervorgehoben. Der N-Terminus des PKI⁵⁻²²-PKA-Komplexes ist im Vergleich zum PKI⁵⁻²⁴-PKA-Komplex verschoben (in Abbildung 33 grün hervorgehoben).

Diese Änderung ist vermutlich mit der Destabilisierung des direkt am *N*-Terminus befindlichen 320-*Loop* korreliert. Weiterhin wurde deutlich, dass der Glycin-reiche *Loop*, der bei Bindung von PKA⁵⁻²⁴ in Richtung des Peptides verschoben wurde, bei der Bindung von PKA⁵⁻²² keine solche Verschiebung aufweist. Wird die Struktur des PKA⁵⁻²²-Komplexes mit der *apo*-PKA-Struktur verglichen (siehe Abbildung 34), so wird die Ursache hierfür deutlicher.

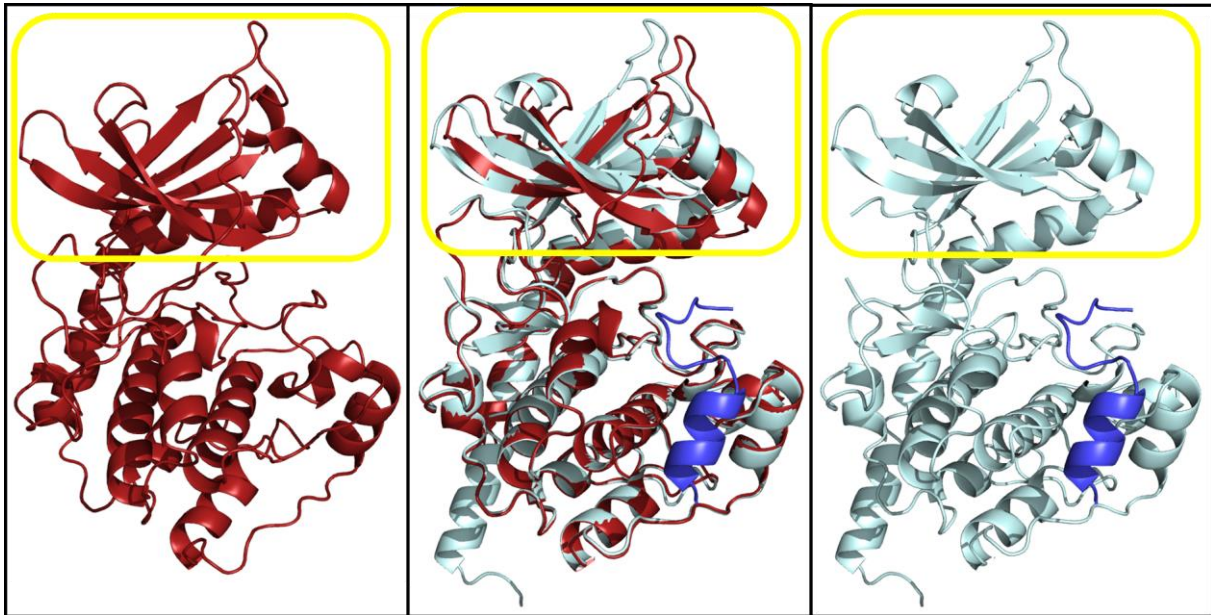


Abbildung 35: Vergleich der *apo*-PKA-Komplex-Struktur (links, rot, PDB-Code 6EH0) und der Struktur des ermittelten PKA-PKI⁵⁻²² Komplexes (hellgrau, rechts, PDB-Code 6ERV). In der Mitte ist die Überlagerung beider Kristallstrukturen gezeigt. Das Protein sowie PKI⁵⁻²² (blau) sind in der Cartoon-Darstellung gezeigt. Hervorgehoben in gelb ist die bei Einführung des verkürzten Peptids verschobene Region.

Bei der Einführung des verkürzten Peptids wird die gesamte obere Domäne der PKA verschoben. Diese Verschiebung, die sowohl im Bereich des β -Faltblattes, als auch im C-terminalen Bereich, beginnend mit dem 320-*Loop* auftritt, führt dazu, dass der Glycin-reiche *Loop* nach oben verschoben wird, so dass er nicht in der Lage ist, mit dem Peptid eine Interaktion einzugehen. Interessanterweise scheint die Verkürzung des Peptids um zwei Aminosäuren einen signifikanten globalen Effekt auf die Orientierung der PKA auszuüben. Zur genaueren Untersuchung auf die Ursache dieses Effektes, wurde die Orientierung von PKI⁵⁻²² im Vergleich zu PKI⁵⁻²⁴ in den Komplexstrukturen verglichen. Dieser Vergleich ist in Abbildung 36 gezeigt.

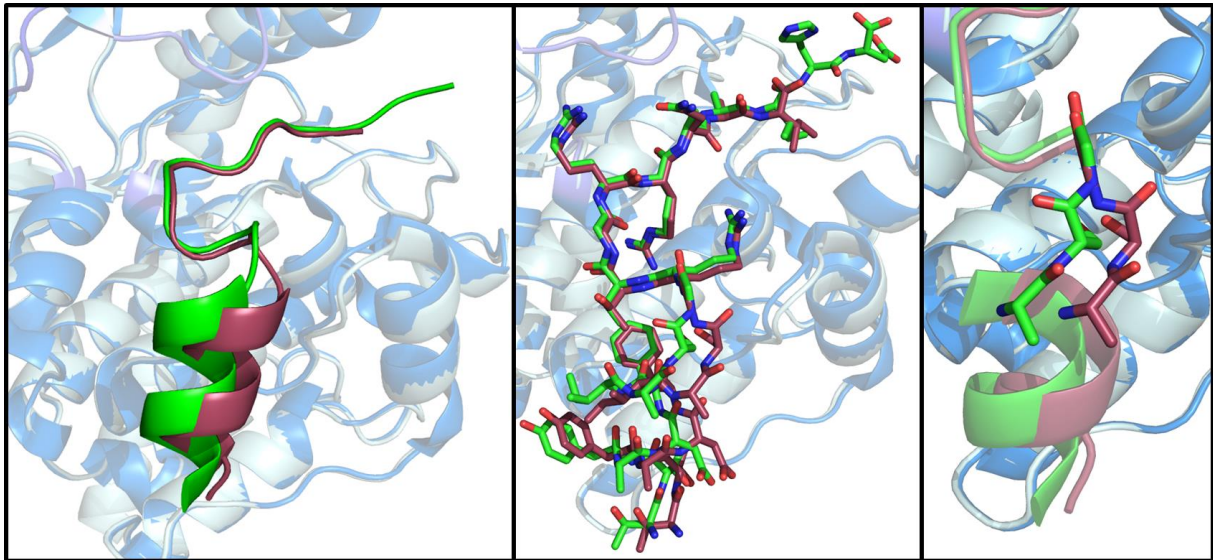


Abbildung 36: Vergleich der Orientierung des peptidischen Liganden in der literaturbekannten PKI⁵⁻²⁴-PKA-Komplex-Struktur (blau, PDB-Code 2GFC) und der Struktur des ermittelten PKA-PKI⁵⁻²² Komplexes (hellblau, PDB-Code 6ERV). Das Protein ist jeweils in der Cartoon-Darstellung. Auf der linken Seite sind PKI⁵⁻²⁴ (grün) und PKI⁵⁻²² (lila) in der Cartoon-Darstellung gezeigt. In der Mitte ist die Orientierung beider Peptide in der Stick-Darstellung gezeigt. Rechts ist eine Ausschnittsvergrößerung des auftretenden Peptidbindungs-Flips von Ser¹³ gezeigt. Die Aminosäuren an Position 12-14 sind in der Stick-Darstellung, alles andere in der Cartoon-Darstellung mit zum Rest der Abbildung analogen Farben gezeigt.

Es zeigte sich, dass der C-terminale Bereich des Peptides durch die Verkürzung quasi unverändert bleibt. Im N-Terminalen Bereich, der als α -Helix vorliegt, tritt dagegen ein Peptidbindungs-Flip an Ser¹³ auf. Dieser Flip sorgt für eine Verschiebung der α -Helix. Durch die Verschiebung werden keine direkten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Peptid und PKA gebrochen oder eingeführt, über indirekte, durch Wassermoleküle vermittelte Wasserstoffbrücken konnte jedoch aufgrund der verhältnismäßig geringen Auflösung keine Aussage getroffen werden. Dieser Peptidbindungs-Flip wurde zwar bereits bei einigen wenigen Strukturen mit PKI⁵⁻²⁴ beobachtet (beispielsweise PDB-Code 4WB6 und 1STC), diese resultieren jedoch meistens aus Mutationen der PKA oder Interaktion mit weiteren Inhibitoren. Die Verkürzung des Peptides dagegen führte auch in weiteren, im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Strukturen zum Auftreten eines Peptidbindungs-Flips, weshalb davon auszugehen ist, dass die Verkürzung des Peptides diesen Flip hervorruft.

6.3 Einführung von Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren in PKI⁵⁻²²

6.3.1 Überblick

Nachdem die Effekte der Verkürzung von PKI⁵⁻²⁴ auf PKI⁵⁻²² ermittelt wurden, konnte begonnen werden, die Effekte bedingt durch die Einführung der Ribo- oder Boronsäure-Aminosäuren auf das Peptidgerüst zu analysieren. Dabei sollte vor allen Dingen getestet werden, ob die Einführung der Aminosäuren an verschiedenen Stellen toleriert wird und welche Positionen sich am besten eignen für die Einführung eines *Linkers* zur Verknüpfung der Peptid- und der ATP-Bindetasche. Im Rahmen der Kooperation wurden acht verschiedene Variationen des Peptides mit Ribo- oder Boronsäure-Aminosäuren zur Verfügung gestellt und für fünf dieser Peptide konnten Komplexe mit der Proteinkinase A kristallisiert und aufgeklärt werden. Für die Peptide PKI(RBS¹⁹)⁵⁻²², PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²² und PKI(RBS²¹)⁵⁻²² konnten jedoch keine Kristalle erhalten werden; Komplexe mit PKI(RBS¹⁹)⁵⁻²² kristallisierten überhaupt nicht während PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²² und PKI(RBS²¹)⁵⁻²² nur in Komplex mit weiteren Liganden kristallisierten.

6.3.2 Vergleich der Strukturen von PKI⁵⁻²² und PKI(RBS¹³)⁵⁻²²

In Abbildung 37 ist ein Vergleich der Kristallstrukturen mit PKI⁵⁻²² und PKI(RBS¹³)⁵⁻²² gezeigt.

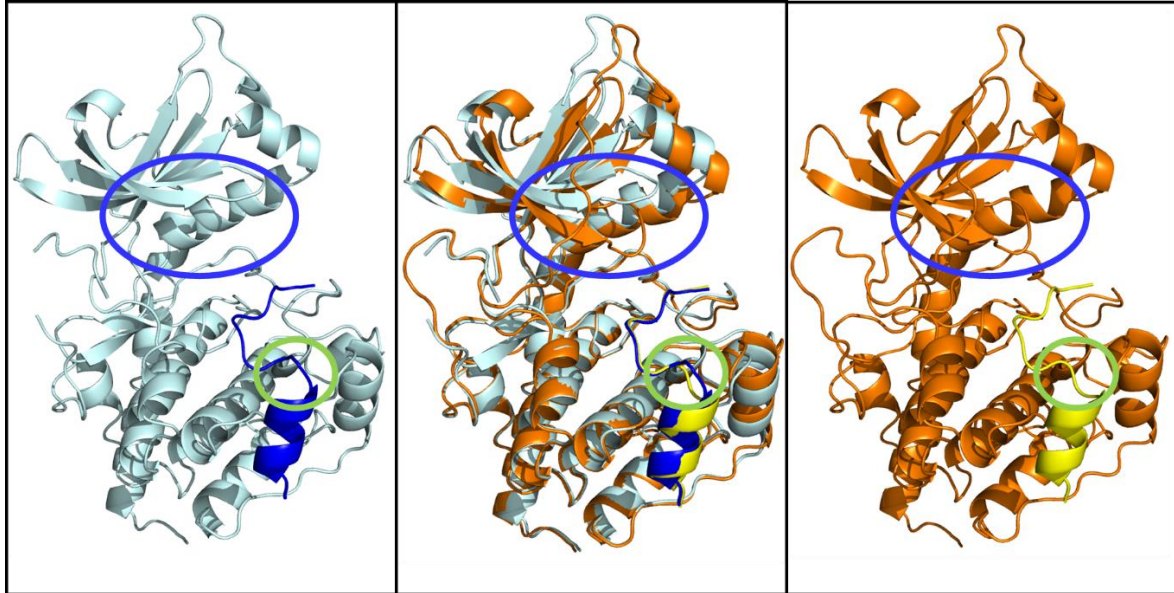


Abbildung 37: Vergleich der Komplexstrukturen in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI⁵⁻²² (links, PKA hellblau, Peptid blau, PDB-Code: 6ERV) und PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²² (rechts, PKA orange, Peptid gelb, PDB-Code: 5OUA). In der Mitte ist die Überlagerung beider Kristallstrukturen gezeigt. In blau hervorgehoben ist der durch Einführung von RBS nach unten verlagerte Glycin-reiche *Loop*, in grün hervorgehoben ist das verschobene Peptid-Rückgrat.

Es zeigte sich, dass bei Einführung eines Riboserins an Position 13, also eines Serin gegen die Riboserin-Variation zu einer Verschiebung der Faltblatt-artigen Domäne der PKA führt. Diese Verschiebung der Domäne führt setzt sich fort in einer Verschiebung des Glycin-reichen *Loops* in Richtung des Peptides. Da eine solche Verschiebung ähnlich zur beobachteten Verschiebung im Vergleich der Komplex-Strukturen von PKA-PKI⁵⁻²⁴ und PKA-PKI⁵⁻²² war, wurden die Struktur des PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-Komplexes ebenfalls mit der Struktur von PKA-PKI⁵⁻²⁴ verglichen. Dieser Vergleich ist in Abbildung 38 gezeigt.

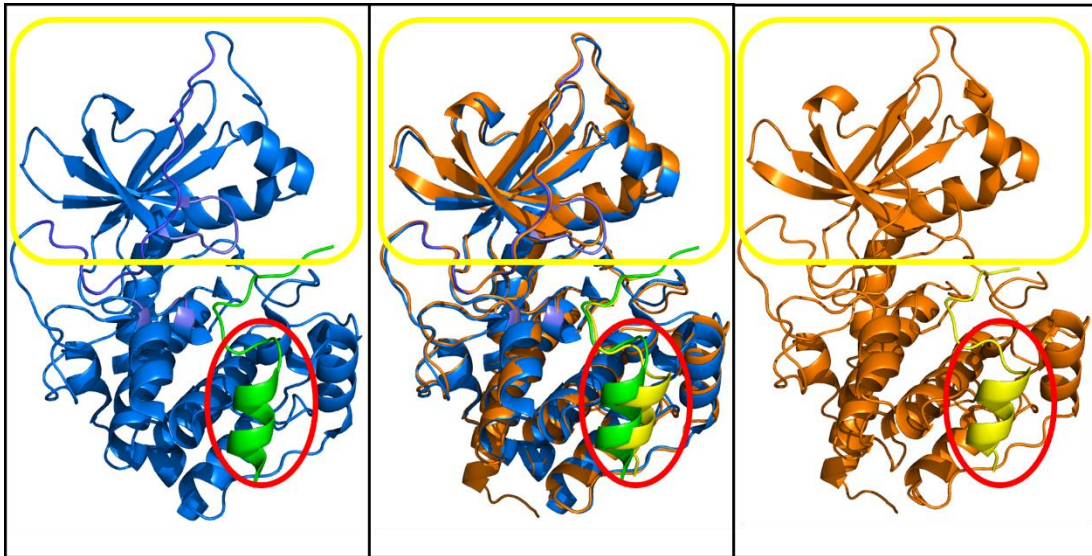


Abbildung 38: Vergleich der Komplexstrukturen in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI⁵⁻²⁴ (links, PKA blau, Peptid grün, PDB-Code: 2GFC) und PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²² (rechts, PKA orange, Peptid gelb, PDB-Code: 5OUA). In der Mitte ist die Überlagerung beider Kristallstrukturen gezeigt. In gelb hervorgehoben ist die im Vergleich zum Komplex aus PKA-PKI⁵⁻²² verschobene Domäne, in Rot hervorgehoben ist das verschobene Peptid-Rückgrat.

Es zeigte sich, dass die Konformation der PKA im PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-Komplex sehr ähnlich zur Konformation im PKA-PKI⁵⁻²⁴-Komplex ist; deutlich ähnlicher als im PKA-PKI⁵⁻²²-Komplex. Dies ist verwunderlich, da die Orientierung des Peptides im PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-Komplex dennoch deutlich ähnlicher zur Orientierung im PKA-PKI⁵⁻²² ist; es tritt ebenfalls der Peptidbindungs-Flip an Position 13 auf. Bei genauerer Betrachtung zeigten sich jedoch auch hier gewisse Unterschiede. Diese sind in Abbildung 39 gezeigt.

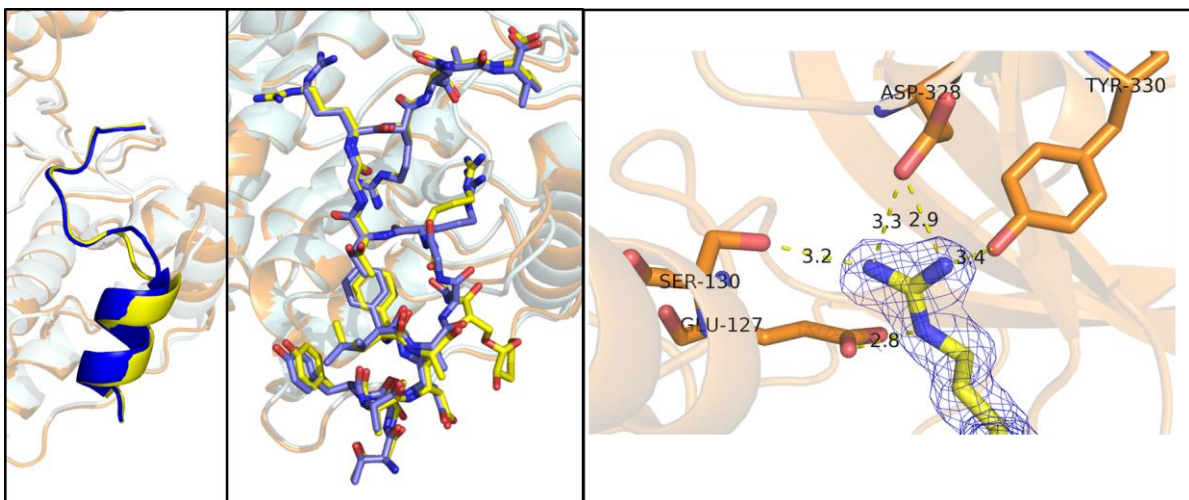


Abbildung 39: Vergleich der Peptide in den Komplexstrukturen von PKA-PKI⁵⁻²² (PKA hellgrau, Peptid blau, PDB-Code: 6ERV) und PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²² (PKA orange, Peptid gelb, PDB-Code: 5OUA), links in der Cartoon-Darstellung, in der Mitte als Stick-Darstellung. Rechts ist die Umgebung von Arg¹⁸ in PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²² gezeigt. Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt.

Im C-terminalen Bereich des Peptides, der in PKI⁵⁻²⁴ und PKI⁵⁻²² beinahe unverändert bindet, kommt es zu einer Änderung des Rotamers von Arginin¹⁸ in PKI(RBS¹³)⁵⁻²². In PKI⁵⁻²⁴ bildet dieses Arginin Wasserstoffbrückenbindungen zu Thr⁵¹ des Glycin-reichen *Loops* aus und stabilisiert somit dessen Orientierung. Obwohl beim Komplex mit PKI(RBS¹³)⁵⁻²² der Glycin-reiche *Loop* ebenfalls in Richtung des Peptides herabgezogen wird, zeigt dessen Arginin¹⁸ keinerlei Interaktion zum Glycin-reichen *Loop* und bildet Wasserstoffbrücken zu Glu¹²⁷, Ser¹³⁰, Asp³²⁸ und Tyr³³⁰ aus. Dieses Netzwerk an Interaktionen ist auch in Abbildung 39 gezeigt. Eine weitere Änderung in der Orientierung des Peptides tritt beim PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²² an RBS¹³ auf. Diese Änderung ist in Abbildung 40 gezeigt.

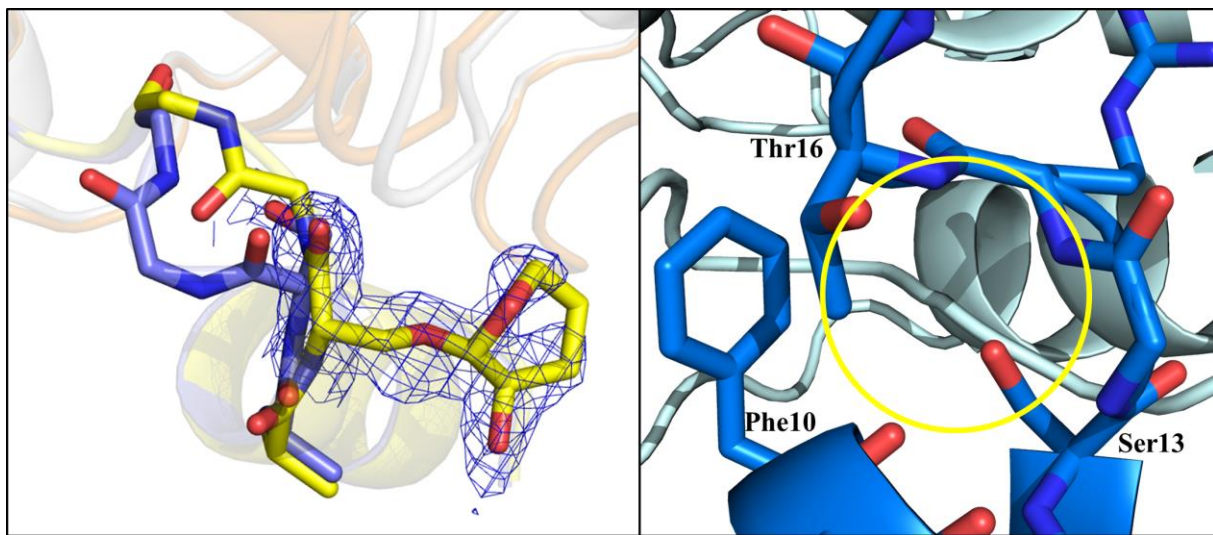


Abbildung 40: Links ist eine Ausschnittsvergrößerung des Vergleichs der Peptide in den Komplexstrukturen von PKA-PKI⁵⁻²² (PKA hellgrau, Peptid-Kohlenstoffe blau, PDB-Code: 6ERV) und PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²² (PKA orange, Peptid-Kohlenstoffe gelb, PDB-Code: 5OUA) in der Stick-Darstellung gezeigt, die den Bereich der Änderung zeigt. Die zum Teil fehlgeordnete Ribose ist ebenfalls in Stick-Darstellung gezeigt. Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt. Rechts ist die Windung der α -Helix von PKI⁵⁻²² gezeigt, bei der eine Änderung durch die Variation mit Riboserin auftritt. Die Färbung ist hierbei analog gehalten. In gelb ist die Stelle hervorgehoben, an der die Ribose von PKI(RBS¹³)⁵⁻²² zum Liegen kommen würde, wenn keinerlei weitere Änderung in der Peptid-Orientierung auftreten würde.

Wie sich zeigte, führte die Einführung der Ribose zu einer Verschiebung des Peptid-Rückgrats. Dies ist durch den hohen sterischen Anspruch der Ribose zu erklären. Wie in Abbildung 40 dargestellt, zeigt das Serin¹³ in PKI⁵⁻²² in Richtung des Threonin¹⁶, jedoch ohne Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung. Die Ribose kann in dieser Orientierung nicht eingeführt werden, da dies zu einem sterischen Konflikt mit Threonin¹⁶ und Phenylalanin¹⁰ führen würde.

Es liegt schlichtweg nicht genügend Platz vor, um die Ribose dort positionieren zu können. Deshalb kommt es zu einer Auslenkung des Peptid-Rückgrates weg vom Protein, damit das Riboserin genügend Platz findet. Dies sorgt für eine vollständige Exposition der Ribose hin zum Lösungsmittel, es treten keine Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein auf. Da die Ribose ausreichend flexibel ist und durch diese Exposition keine Fixierung an das Protein aufweist, ist sie in der Struktur zum überwiegenden Teil fehlgeordnet und konnte nicht eingebaut werden. Aus den Kristallstrukturen wird offensichtlich, dass die Einführung eines Riboserins in das Peptid grundsätzlich toleriert wird, jedoch eine strukturelle Änderung auslösen kann. Weiterhin zeigt sich, dass Position 13 zur Einführung eines *Linkers* zur Verknüpfung von Peptid- und ATP-Bindetasche ungeeignet ist; die Ribose ist zu weit entfernt von der ATP-Bindetasche.

6.3.3 Vergleich der Strukturen von PKI⁵⁻²² und PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²

In Abbildung 41 ist ein Vergleich der Kristallstrukturen mit PKI⁵⁻²² und PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² gezeigt.

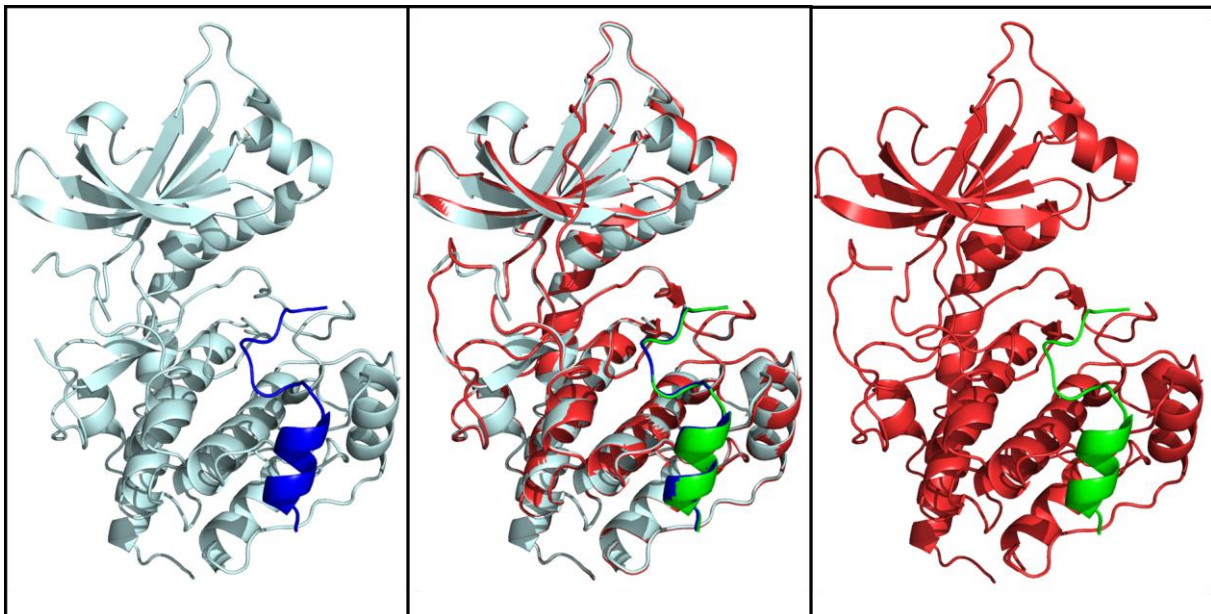


Abbildung 41: Vergleich der Komplexstrukturen in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI⁵⁻²² (links, PKA hellblau, Peptid blau, PDB-Code: 6ERV) und PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² (rechts, PKA rot, Peptid grün, PDB-Code: 5NTJ). In der Mitte ist die Überlagerung beider Kristallstrukturen gezeigt.

Bei der Überlagerung der Strukturen wird deutlich, dass durch Variation von Arg¹⁸ gegen RBS weder eine signifikante Änderung in der Konformation der PKA, noch eine signifikante Änderung in der Konformation des Peptides auftritt. Im Gegensatz zu der deutlichen Veränderung der Konformationen bei PKI(RBS¹³)⁵⁻²² scheint die Einführung der Ribose an Position 18 besser toleriert zu werden. Zur genaueren Untersuchung der durch die Einführung der Ribose auftretenden Effekte, mussten die Seitenketten des Peptids und die genaue Umgebung der Ribose betrachtet werden. Diese sind in Abbildung 42 gezeigt.

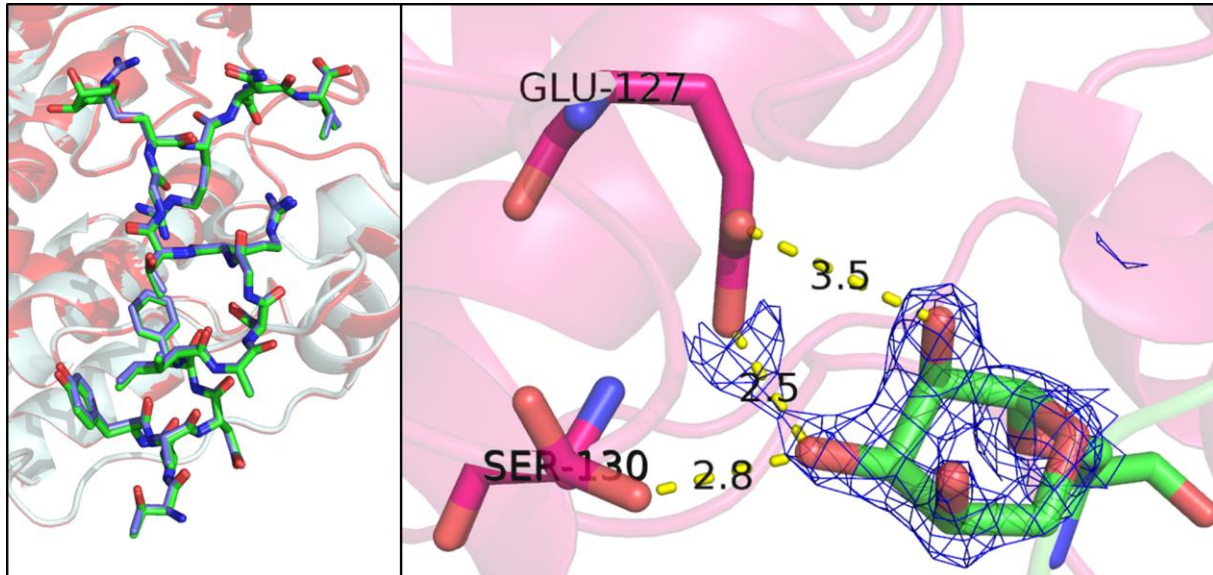


Abbildung 42: Links gezeigt ist der Vergleich der Peptid-Orientierung von PKA-PKI⁵⁻²² (PKA hellblau, Peptid-Kohlenstoffe blau, PDB-Code: 6ERV und PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² (PKA rot, Peptid-Kohlenstoffe grün, PDB-Code: 5NTJ). Das Protein ist in Cartoon-Darstellung, das Peptid in der Stick-Darstellung gezeigt. Rechts gezeigt ist die Umgebung der Ribose in PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² (PKA in Cartoon Darstellung rot, PKA-Kohlenstoffe in Stick Darstellung hellrot, Peptid in Stick-Darstellung mit grünen Kohlenstoffen). Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt.

Bei genauerer Betrachtung zeigte sich, dass auch in der Orientierung der Seitenketten des Peptides keinerlei Änderung auftritt. Die einzige Änderung ist bei der variierten Seitenkette zu finden. Die Ribose zeigt im Gegensatz zum Arg¹⁸ im Wildtyp PKI⁵⁻²² vom Glycin-reichen *Loop* weg und nimmt damit eine ähnliche Orientierung wie Arg¹⁸ in PKI(RBS¹³)⁵⁻²² ein. Die Ribose geht hierbei wie Arg¹⁸ in PKI(RBS¹³)⁵⁻²² Wasserstoffbrückenbindungen mit Glu¹²⁷ und Ser¹³⁰ ein. Die Wasserstoffbrücken zu Asp³²⁸ und Tyr³³⁰ gehen allerdings bei R18RBS verloren.

Der Verlust dieser Wasserstoffbrücken könnte ein Grund für die schlechtere Affinität von PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² sein; in der Literatur ist beschrieben, dass Arg¹⁸ essentiell für die Affinität des PKI-Peptids ist.^[22] Da in PKI(RBS¹³)⁵⁻²² eine Konformationsänderung des Arginins¹⁸ auftritt, jedoch weiterhin eine vergleichbare Affinität zu PKI⁵⁻²² nachzuweisen ist, scheint die reine Orientierung weg vom Glycin-reichen *Loop* nicht zu einem Verlust der Affinität zu führen. Weiterhin zeigt sich, dass Position 18 zur Einführung eines *Linkers* zur Verknüpfung von Peptid- und ATP-Bindetasche geeignet ist; die Ribose nimmt eine ähnliche Orientierung ein wie Arg¹⁸, das als katalytisch wichtiger Rest eine Interaktion mit ATP in der Bindetasche der Kinase eingeht.

6.3.4 Vergleich der Strukturen von PKI⁵⁻²² und PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²

In Abbildung 43 ist ein Vergleich der Kristallstrukturen mit PKI⁵⁻²² und PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² gezeigt.

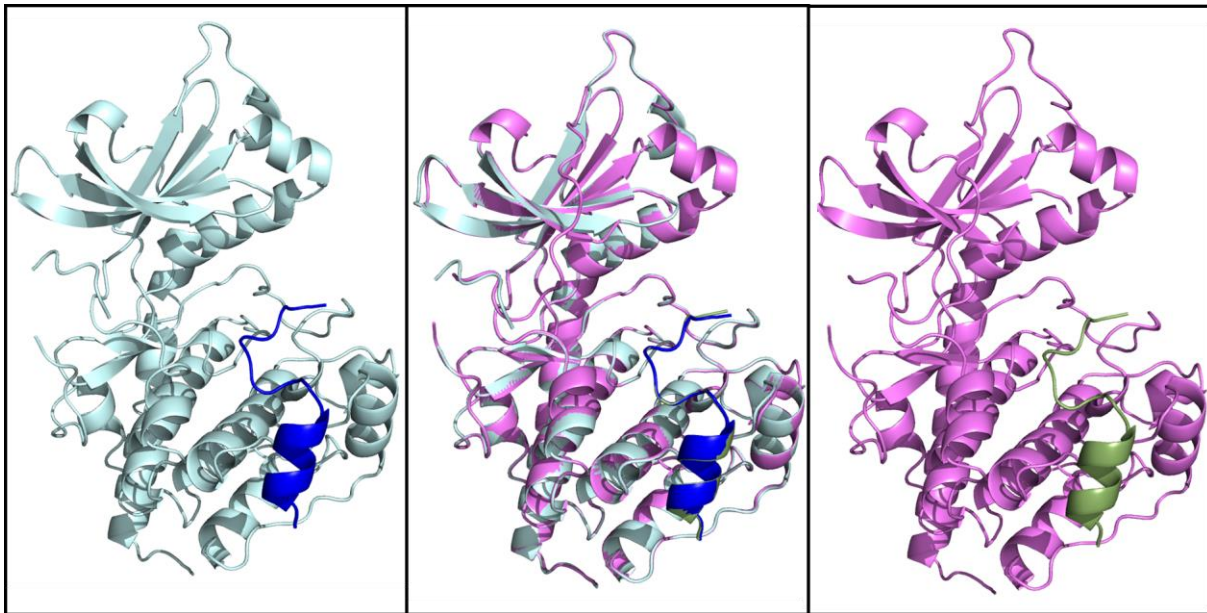


Abbildung 43: Vergleich der Komplexstrukturen in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI⁵⁻²² (links, PKA hellblau, Peptid blau, PDB-Code: 6ERV) und PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² (rechts, PKA violett, Peptid grün, PDB-Code: 6ERU). In der Mitte ist die Überlagerung beider Kristallstrukturen gezeigt.

Es zeigte sich, dass wie bereits bei PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² keine signifikante Veränderung der Konformation bei PKA oder Peptid auftritt. Somit musste bei PKI(RBS²⁰)⁵⁻²², das eine N20RBS-Variation aufweist ebenfalls eine genauere Analyse des Peptides und des Ortes der Variation durchgeführt werden. Diese Analyse ist in Abbildung 44 gezeigt.

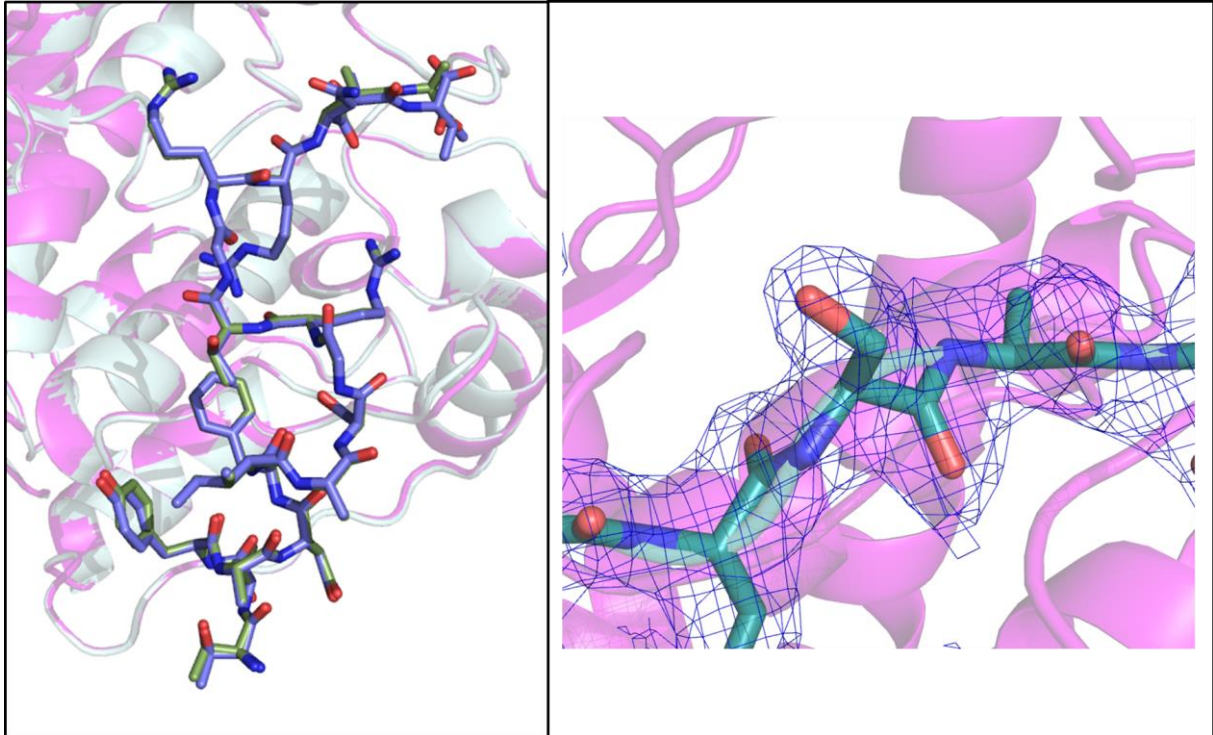


Abbildung 44: Links gezeigt ist der Vergleich der Peptid-Orientierung von PKA-PKI⁵⁻²² (PKA hellblau, Peptid-Kohlenstoffe blau, PDB-Code: 6ERV) und PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² (PKA violett, Peptid-Kohlenstoffe grün, PDB-Code: 6ERU). Das Protein ist in Cartoon-Darstellung, das Peptid in der Stick-Darstellung gezeigt. Rechts gezeigt ist die Umgebung des Ortes der Variation in PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² (PKA in Cartoon Darstellung violett, Peptid in Stick-Darstellung, Peptid-Kohlenstoffe grün.). Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt.

Es zeigte sich, dass in der Orientierung der Seitenketten des Peptides keinerlei Änderung ausser dem Auftreten eines unterschiedlichen Rotamers des C-terminalen Isoleucins auftritt. Dies liegt jedoch vermutlich weniger an der Variation und eher an der hohen Flexibilität des terminalen Isoleucins. Der Ort der Variation, also der Ersatz von Asn²⁰ durch RBS²⁰, belässt die gleiche Orientierung der Seitenkette, jedoch konnte die Ausrichtung der Ribose nicht beurteilt werden, da sie aufgrund ihrer hohen Flexibilität fehlgeordnet vorlag und die Seitenkette bis zum Ende der Serin-Seitenkette in der Elektronendichte definiert war. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Ribose analog zum Asparagin in Richtung der ATP-Bindetasche ausgerichtet ist und somit auch als Ort zur Einführung eines *Linkers* geeignet erscheint.

6.3.5 Vergleich der Strukturen von PKI⁵⁻²² und PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²

Für den Komplex aus PKA und PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²² konnte nur ein schlechter Datensatz mit einer Auflösung von 2,06 Å erhalten werden. In der daraus bestimmbaren Struktur waren große Teile des Glycin-reichen *Loops* fehlgeordnet und das eingeführte Ribothreonin war nur bis zu den Atomen des Threonins in der Dichte sichtbar; die Elektronendichte für die Ribose war nicht eindeutig zuweisbar. Diese Elektronendichte ist in Abbildung 45 gezeigt.

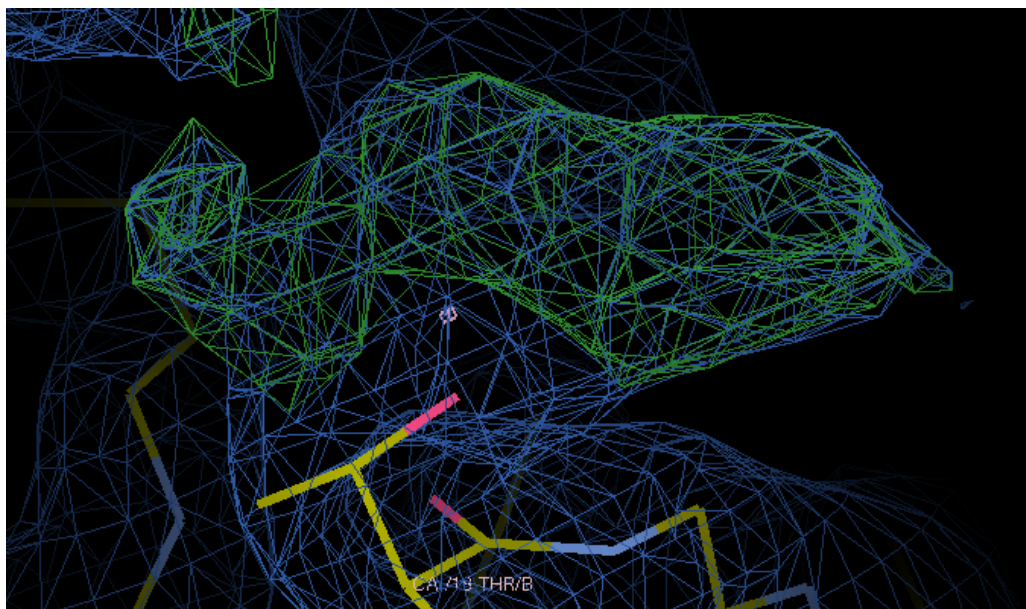


Abbildung 45: In Coot erhaltene Elektronendichte für die Ribose in PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²². In grün ist die mF_o-F_c-Elektronendichte bei 3 σ gezeigt, während die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ in blau gezeigt ist.

In den erkennbaren Dichtebereichen sowohl des Proteins und des Peptids konnte hinsichtlich der Orientierung der Seitenkette keinerlei Änderung im Vergleich mit der PKA-PKI⁵⁻²²-Komplex-Struktur beobachtet werden. Da keinerlei Änderung wahrnehmbar war und der über die Mutation eingeführte Ribosering unsichtbar blieb bis zum Teil der schon wie im nativen Peptid als Threonin erkennbar war, wurde die Struktur nicht in der RSCPDDB deponiert. Die einzige Aussage, die aus der Struktur gezogen werden kann, war, dass bei Variation des Threonins zu Ribothreonin keine Änderung der Peptidorientierung auftritt und somit die Position nicht zur Verknüpfung mit der ATP-Bindetasche geeignet ist; die Entfernung zu dieser Bindetasche ist zu groß.

6.3.6 Beurteilung der Eignung von PKI(RBS¹⁹)⁵⁻²², PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²² und PKI(RBS²¹)⁵⁻²² zur Verknüpfung von ATP- und Peptid-Bindetasche

Für die Varianten PKI(RBS¹⁹)⁵⁻²², PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²² und PKI(RBS²¹)⁵⁻²² konnten keine Kristallstrukturen erhalten werden, weshalb ihre Eignung zur Bildung von *Self-Assembly*-Komplexen nicht im Vorfeld beurteilt werden konnte. Für PKI(RBS¹⁹)⁵⁻²² konnten auch in Komplex mit weiteren Liganden keinerlei Kristalle erhalten werden. Ein *Microseeding-Screen* am MarXtal, die Variation von Methanol und die Änderung des pH-Wertes, sowie Versuche mit *Resoaking* führten zu keinerlei Erfolgen. Vermutlich induziert dieses Peptid eine Änderung des Bindungsmodus, die nicht mehr mit der Kristallpackung vereinbar ist. Die extrem niedrige Affinität in den Bindungsassays bekräftigte diese Vermutung. Für PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²² und PKI(RBS²¹)⁵⁻²² konnten zwar keine Strukturen ohne Zugabe von weiteren Liganden erhalten werden, unter Zugabe von Fasudil-Derivaten konnten jedoch Strukturen erhalten werden. Da PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²² und PKI(RBS²¹)⁵⁻²² Riboserin-Varianten aufweisen, deren Ort der Variation sehr nahe an den in Richtung der ATP-Bindetasche zeigenden Aminosäuren Arg¹⁸ und Asn²⁰ lagen, wurde erwartet, dass sie potentiell zur Verknüpfung beider Bindetaschen geeignet waren.

6.3.7 Vergleich der Strukturen von PKI⁵⁻²² und PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²²

In Abbildung 46 ist ein Vergleich der Kristallstrukturen mit PKI⁵⁻²² und PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²², der einzigen Variation mit Boronsäure-Aminosäure gezeigt.

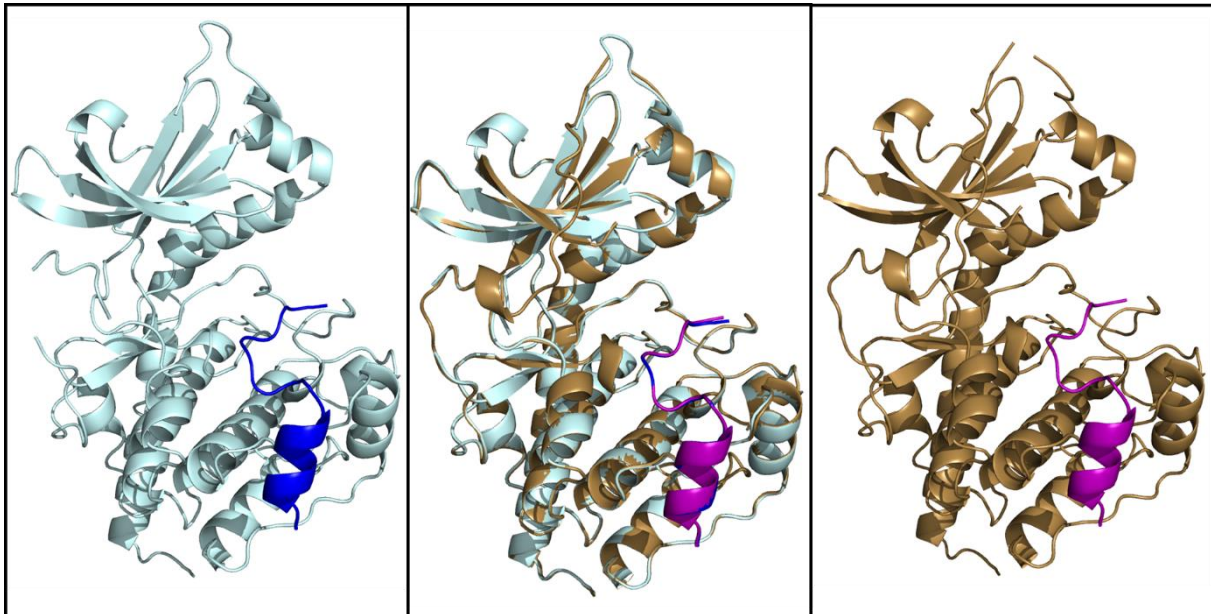


Abbildung 46: Vergleich der Komplexstrukturen in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI⁵⁻²² (links, PKA hellblau, Peptid blau, PDB-Code: 6ERV) und PKA-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² (rechts, PKA goldbraun, Peptid violett, PDB-Code: 5OUS). In der Mitte ist die Überlagerung beider Kristallstrukturen gezeigt.

Es zeigte sich, dass wie bereits bei PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² keine signifikante Veränderung der Konformation weder bei der PKA noch bei dem Peptid auftritt. Somit musste bei PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²², bei dem eine Boronsäure-Aminosäure an Position 18 eingeführt wurde, ebenfalls eine genauere Analyse des Peptides und des Ortes der Variation durchgeführt werden. Diese Analyse ist in Abbildung 47 gezeigt.

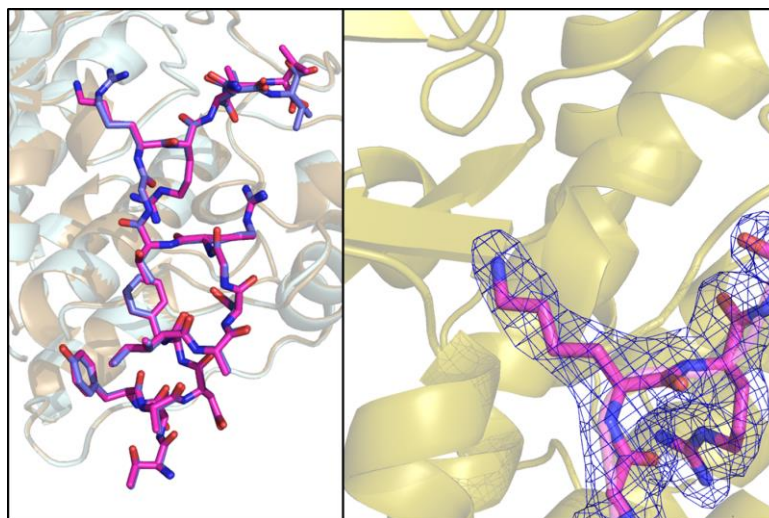


Abbildung 47: Links gezeigt ist der Vergleich der Peptid-Orientierung von PKA-PKI⁵⁻²² (PKA hellblau, Peptid-Kohlenstoffe blau, PDB-Code: 6ERV) und PKA-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² (PKA als Cartoon goldbraun, Peptid als Stickviolett, PDB-Code: 5OUS). Rechts gezeigt ist die Umgebung des Ortes der Variation in PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² (PKA als Cartoon goldbraun, Peptid als Stick magenta.). Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt.

Es zeigte sich, dass in der Orientierung der Seitenketten des Peptides keinerlei Änderung ausser dem Auftreten eines unterschiedlichen Rotamers des C-terminalen Isoleucins auftritt. Dies liegt jedoch vermutlich weniger an der Variation an Position 18 und eher an der hohen Flexibilität des terminalen Isoleucins. Der Ort der Variation, also Arg¹⁸ respektive BAR¹⁸, zeigt eine ähnliche Orientierung der Seitenkette, jedoch scheint BAR¹⁸ eher eine Ausrichtung wie Arg¹⁸ in PKI(RBS¹³)⁵⁻²² als von Arg¹⁸ in PKI⁵⁻²² einzunehmen. Die Ausrichtung der sterisch anspruchsvollen Phenylboronsäure konnte jedoch nicht beurteilt werden, da sie in der Kristallstruktur fehlgeordnet vorlag und die Seitenkette nur als Lysin sichtbar war. Im Bindungsassay konnte für dieses Peptid eine schlechte Affinität nachgewiesen werden. Dies könnte daraus resultieren, dass die Wasserstoffbrücken, die Arg¹⁸ normalerweise ausbildet, verloren gehen. Zwar ist es möglich, dass innerhalb der Bindetasche geordnete Wassermoleküle verdrängt werden, sodass möglicherweise ein entropischer Gewinn stattfindet, jedoch scheint der Verlust von polaren Interaktionen und somit enthalpischen Beiträgen der Affinität deutlich stärker zu sein. Aufgrund der schlechten Auflösung der Struktur von 2,21 Å und der fehlgeordnet vorliegenden Phenylboronsäure konnten hinsichtlich der (un-)vorteilhaften Beiträge der Bindung jedoch keine Aussagen getroffen werden. Eine Bestimmung der enthalpischen und entropischen Beiträge der Bindung in einer ITC-Messung wäre für eine solche Argumentation vorteilhaft gewesen, jedoch konnte eine solche Messung aufgrund der schlechten Affinität und der somit benötigten extrem hohen Mengen an Substanz für die Messung nicht durchgeführt werden.

Da die Ausrichtung von BAR¹⁸ zumindestens partiell bis zu Anfang des fehlgeordneten Bereichs mit der möglichen Ausrichtung von Arg¹⁸ in anderen PKI⁵⁻²²-Variationen übereinstimmt, wurde PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² als potentiell geeignet zur Verknüpfung der ATP- und Peptid-Bindetasche beurteilt. Dabei wurde jedoch eine Verknüpfung mit der Fünfring-Ribose der in der ATP-Bindetasche gebundenen Adenosinphosphaten (AMP/ADP/ATP) und nicht von Fasudil-Derivaten angestrebt.

6.4 Versuche zur Verknüpfung von Ribo-Aminosäuren mit Boronsäure-Fasudilen

6.4.1 Überblick

Durch die Strukturaufklärung der Komplexe zwischen PKA und PKI⁵⁻²²-Variationen konnten vier Positionen identifiziert werden, die durch Einführung einer Ribose zur Verknüpfung mit einem Boronsäure-Fasudil geeignet schienen. Somit wurden die Varianten PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²², PKI(RBS²⁰)⁵⁻²², PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²² und PKI(RBS²¹)⁵⁻²² in Komplex mit der PKA und den Boronsäure-Fasudilen BFS und BFF, sowie mit dem literaturbekannten Fasudil kristallisiert. Die Komplexe mit Fasudil sollten hierbei zum Vergleich des Bindungsmodus dienen, um etwaige vorteilhafte ligandeninduzierte Effekte zu identifizieren, die das Design weiterer, besser geeigneter Boronsäure-Fasudile ermöglichen. Bis auf die Kombination von PKA-PKI(RBS²¹)⁵⁻²²-Fasudil konnten für alle Komplexe Strukturen erhalten werden. Die Kristalle von PKA-PKI(RBS²¹)⁵⁻²²-Fasudil konnten zwar zur Sammlung von Datensätzen verwendet werden, diese wiesen jedoch suboptimale Qualität auf. Im Zeitrahmen dieser Arbeit konnten keine Optimierungen mehr durchgeführt werden, die fehlende Struktur wurde allerdings als nicht essentiell eingestuft.

6.4.2 Versuche zur Verknüpfung von PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² mit Boronsäure-Fasudilen

Zur Beurteilung von ligandeninduzierten Effekten wurden zuerst die Strukturen des PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-Komplexes und des PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-Fasudil-Komplexes miteinander verglichen. Dieser Vergleich ist in Abbildung 48 gezeigt.

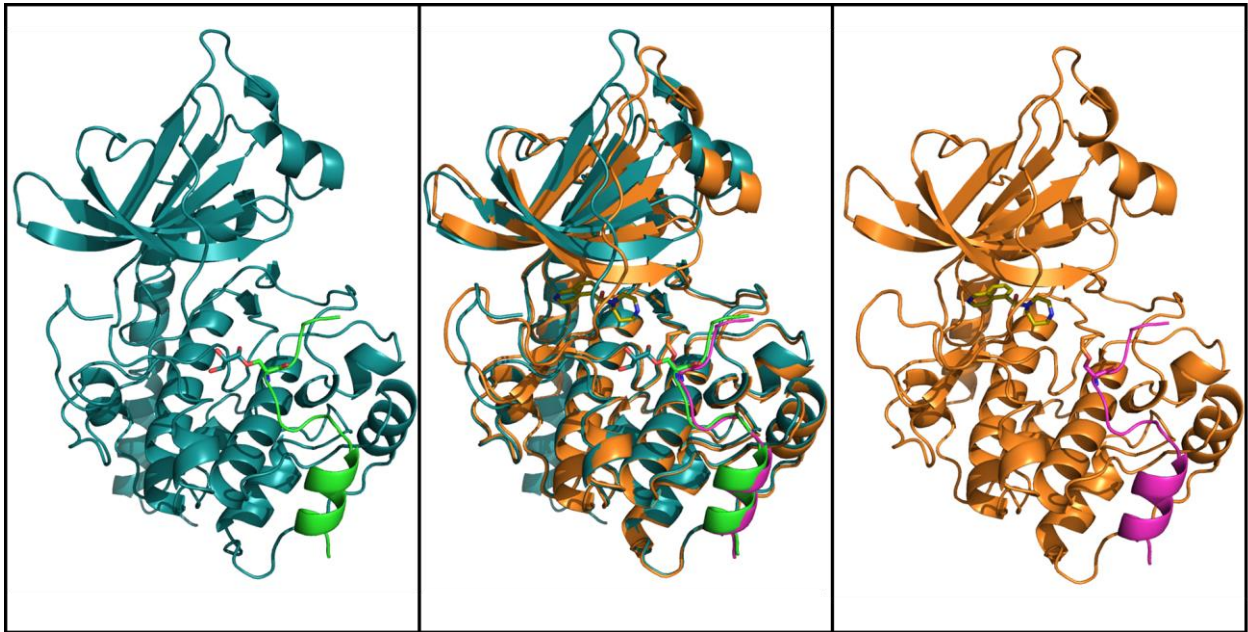


Abbildung 48: Vergleich der Komplexstrukturen in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² (links, PKA blaugrün, Peptid grün, PDB-Code: 5NTJ) und PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² (rechts, PKA orange, Peptid violett, PDB-Code: 5NW8). In der Mitte ist die Überlagerung beider Kristallstrukturen gezeigt.

Die Überlagerung der Strukturen zeigte, dass bei Einführung des Fasudils eine Verschiebung des Glycin-reichen *Loops* in Richtung des Peptides und eine sehr schwache Verschiebung des Peptides fort von der *hinge*-Bindetasche stattfindet. Eine genauere Betrachtung des Peptides ist in Abbildung 49 gezeigt.

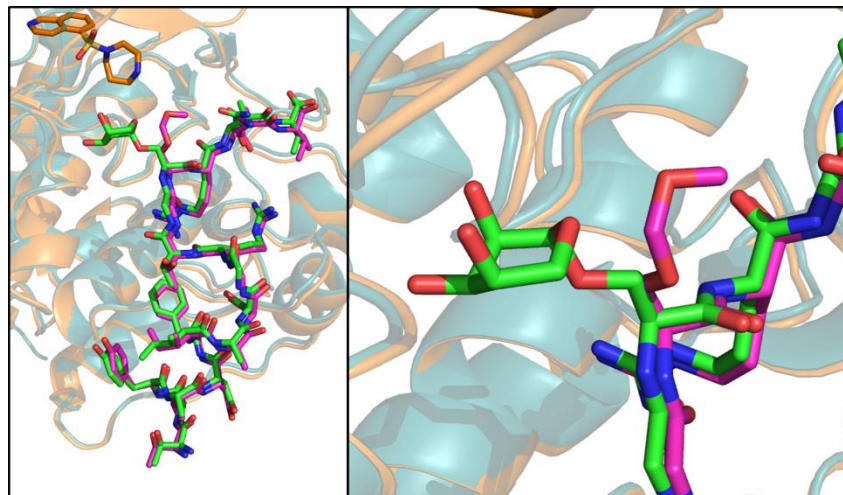


Abbildung 49: Vergleich der Orientierung von PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² in den Komplexstrukturen PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² (PKA als Cartoon blaugrün, Peptid als Stick grün, PDB-Code: 5NTJ) und PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-Fasudil (PKA als Cartoon orange, Peptid als Stick violett, PDB-Code: 5NW8). Rechts gezeigt ist eine Ausschnittsvergrößerung des Ortes der Variation R18RBS. Die Ribose in der PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-Fasudil-Komplexstruktur ist größtenteils fehlgeordnet.

Bis auf die schwache Verschiebung weg von der *hinge*-Region tritt keine Änderung in der Orientierung der Seitenketten des Peptids auf. Die Orientierung der Ribose konnte nicht aussagekräftig verglichen werden, da sie in der Struktur des PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-Fasudil-Komplexes größtenteils fehlgeordnet vorliegt. Es schien jedoch so, als würde die Ribose in diesem Komplex in einem anderen Rotamer vorliegen als in der Struktur ohne Fasudil.

Nachdem die durch Einführung von Fasudil auftretenden Effekte bestimmt wurden, konnte die Einführung der Boronsäure-Fasudile BFS und BFF betrachtet werden. In Abbildung 50 ist ein Vergleich der Strukturen von PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² mit Fasudil, BFS und BFF gezeigt.

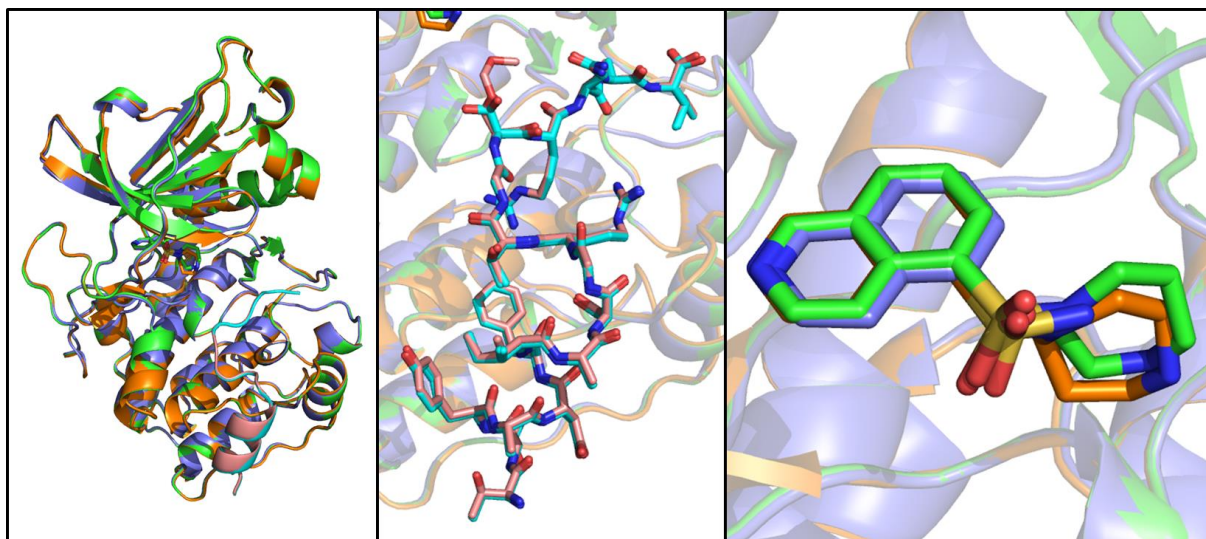


Abbildung 50: Links gezeigt ist die Überlagerung der Cartoon-Darstellung der Komplexstrukturen von PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-Fasudil (PKA orange, Peptid rosa, PDB-Code: 5NW8), PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-BFS (PKA grün, Peptid lila, nicht in der RSCPDDB deponiert) und PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-BFF (PKA blau, Peptid türkis, nicht in der RSCPDDB deponiert) Fasudil, BFS und BFF sind in der Stick-Darstellung gezeigt. In der Mitte ist eine Ausschnittsvergrößerung der überlagerten Peptide in Stick-Darstellung gezeigt. Rechts ist eine Überlagerung von Fasudil, BFS und BFF in Stick-Darstellung gezeigt.

Es zeigte sich, dass weder in der Konformation der PKA, noch in der des Peptides ein Unterschied bei Einführung der Phenylboronsäure oder der Aufspaltung des 1,4-Homopiperazin-Ringes von Fasudil auftritt. Ebenfalls lagen die Ribosen weiterhin sehr fehlgeordnet vor, sodass keine Aussage über die genaue Orientierung gemacht werden konnte. In der Orientierung der Fasudil-Derivate tritt bei Einführung der Phenylboronsäure eine schwache Verschiebung des 1,4-Homopiperazin-Ringes auf. Über Effekte, die durch die Öffnung des Ringes auftreten und die neu eingeführten Interaktionen konnte keine Aussage gemacht werden, da die Boronsäure-Fasudile zum großen Teil fehlgeordnet vorlagen.

Hinsichtlich der Verknüpfung der Boronsäure mit der Ribose scheint die Kombination aus PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² und BFS oder BFF nicht erfolgsversprechend zu sein. Obwohl die Ribose an einer beinahe idealen Position zur Interaktion mit der ATP-Bindetasche liegt, wie in der PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-Komplexstruktur ersichtlich war (siehe Kapitel 6.3.3), scheint die Verknüpfung mit der Boronsäure zu unvorteilhaft zu sein, dass sie sich in dem Protein ausbildet. Beide Komponenten liegen stark fehlgeordnet vor, scheinen sich somit eher auszuweichen zu wollen, als eine Verknüpfung einzugehen. Wird versucht die Ribose und die Boronsäure in die nicht signifikante Elektronendichte in der Kristallstruktur von PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-BFS zu modellieren, so werden Interaktionen wie in Abbildung 51 gezeigt erhalten.

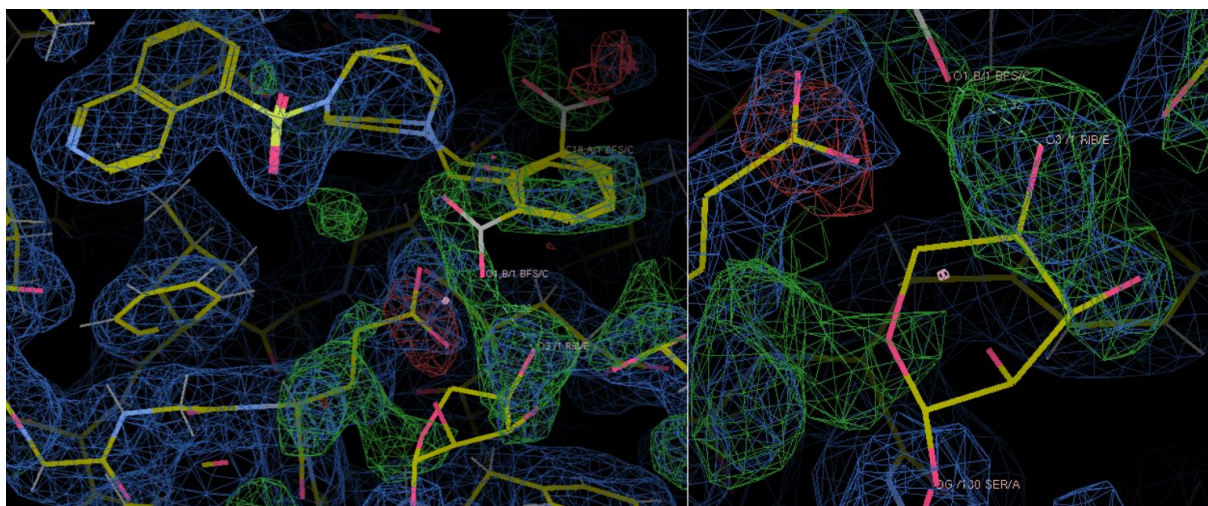


Abbildung 51: In Coot durchgeführte Modellierung der Boronsäure und der Ribose in der PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-BFS-Komplexstruktur. Rechts ist eine Ausschnittsvergrößerung der Ribose gezeigt. In grün ist die mF_o-F_c-Elektronendichte bei 3 σ gezeigt, während die 2 mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ in blau konturiert ist.

Bei der Modellierung wurde ersichtlich, dass beide Interaktionspartner grundsätzlich in Kontakt miteinander treten könnten. Bei einer Platzierung in die Elektronendichte, die allerdings als nicht signifikant gelten muss, wird eine kurze Wasserstoffbrückenbindung von 2,3 Å Länge als denkbarer Kontakt vorgeschlagen. Diese für eine Wasserstoffbrücke zu kurze Distanz resultiert als Ergebnis einer Modellierung in die nur rudimentär definierte Elektronendichte. In dieser Ausrichtung würden zusätzlich sterische Konflikte mit Glu¹²⁷ auftreten. Denkbar wäre ebenfalls dass eine kovalente Verknüpfung zwischen der Boronsäuregruppe und Glu¹²⁷ ausgebildet wurde, die Elektronendichte war jedoch zu schlecht definiert um eine solche Verknüpfung unzweifelhaft zu bestätigen oder zu widerlegen.

In der Struktur mit PKA-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²²-BFS tritt eine solche Verknüpfung zwischen Boronsäurerest und Säurefunktion von Glu¹²⁷ auf (siehe Abbildung 71). Für den Komplex aus PKA, PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² und BFF konnte keine Modellierung durchgeführt werden, da die BFF bereits ab den Atomen der Sulfonamidgruppe nicht mehr signifikant in der Elektronendichte zu erkennen ist.

6.4.3 Versuche zur Verknüpfung von PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² mit Boronsäure-Fasudilen

Wie bereits bei der Serie von PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² mit Fasudil-Derivaten mussten zuerst möglichenligandeninduzierte Effekte durch die Einführung des Fasudil identifiziert werden. Der Vergleich der Kristallstrukturen von PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² und PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-Fasudil ist in Abbildung 52 gezeigt.

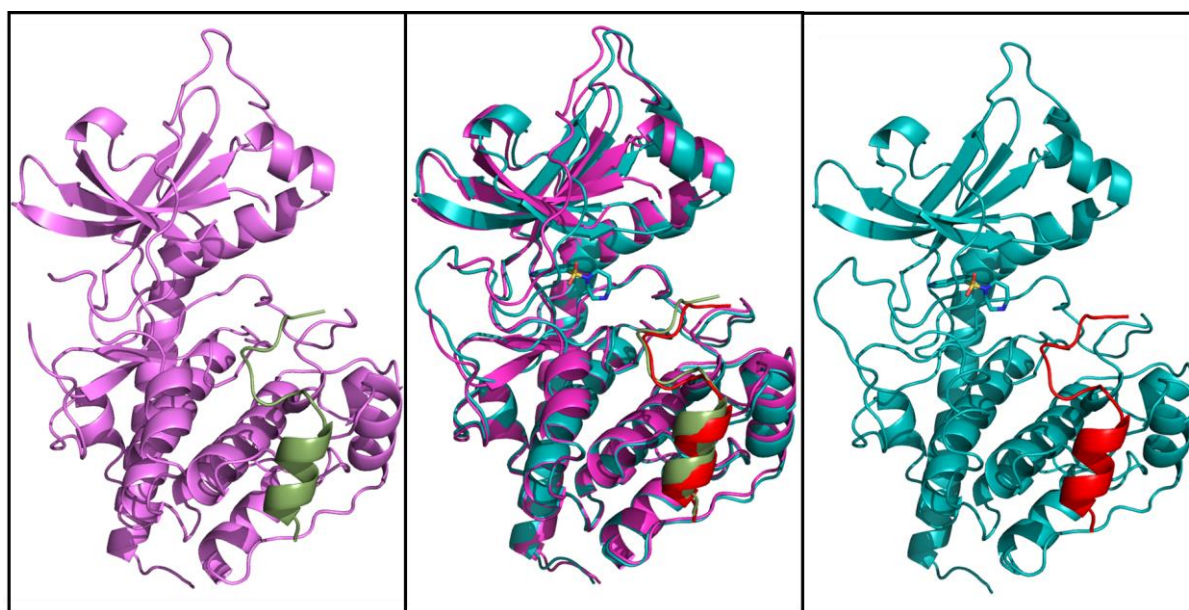


Abbildung 52: Vergleich der Komplexstrukturen in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² (links, PKA lila, Peptid grün, PDB-Code: 6ERU) und PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-Fasudil (rechts, PKA türkis, Peptid rot, PDB-Code: 5O0E).

In der Mitte ist die Überlagerung beider Kristallstrukturen gezeigt. Fasudil ist in allen Darstellungen in der Stick-Darstellung gezeigt, wobei die Kohlenstoffe türkis gefärbt sind.

Wie bereits in der Serie mit PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² und Fasudil tritt bei Einführung des Fasudils eine schwache Verschiebung des Glycin-reichen *Loops* in Richtung des Peptids auf und das Peptid wird leicht weg von der *hinge*-Region geschoben. Eine genauere Betrachtung des Peptides ist in Abbildung 53 gezeigt.

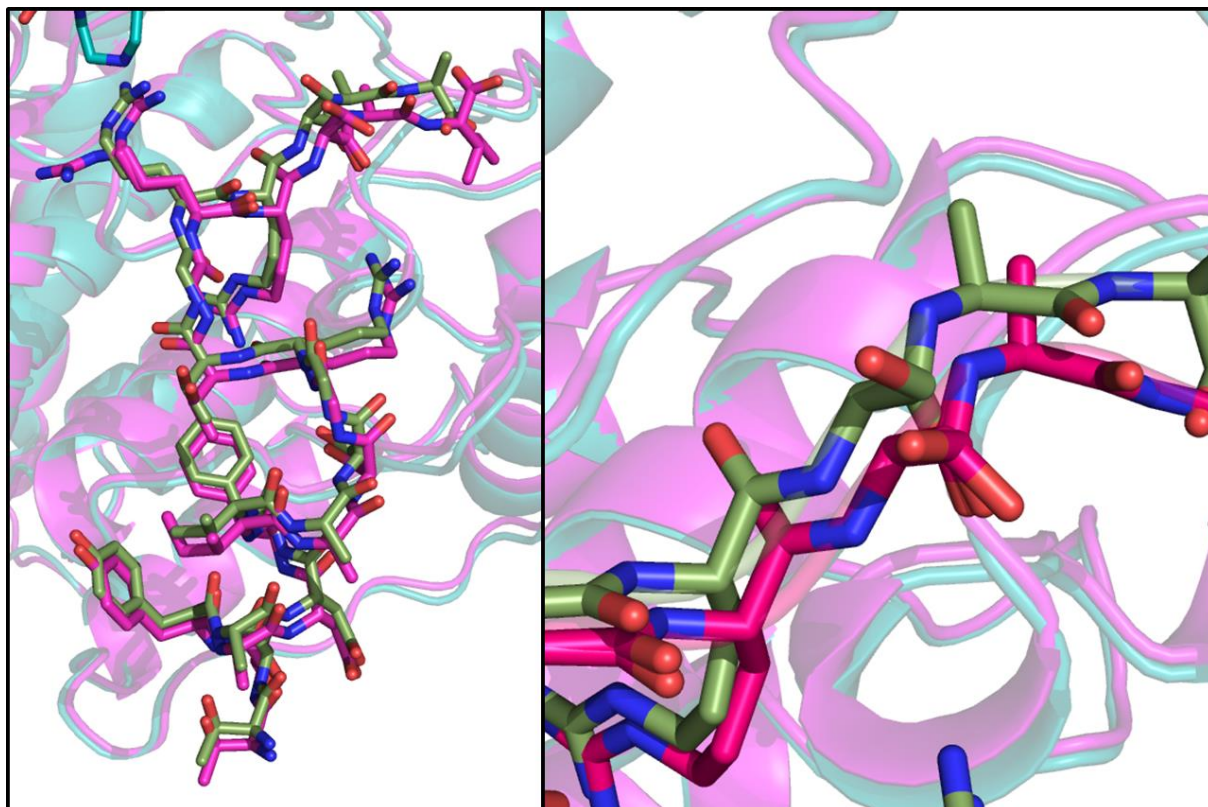


Abbildung 53: Links gezeigt ist der Vergleich der Orientierung von PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² in den Komplexstrukturen PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² (PKA in der Cartoon-Darstellung lila, Peptid in der Stick-Darstellung grün, PDB-Code: 6ERU) und PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-Fasudil (PKA in der Cartoon-Darstellung türkis, Peptid in der Stick-Darstellung hellrot, PDB-Code: 5O0E). Fasudil ist in der Stick-Darstellung gezeigt, wobei die Kohlenstoffe türkis gefärbt sind. Rechts gezeigt ist eine Ausschnittsvergrößerung des Ortes der Variation S20RBS. Die Ribose ist fehlgeordnet.

Es wurde ersichtlich, dass keine großen Änderungen in der Konformation der Peptid-Seitenketten stattfindet. Erwähnenswert ist das Auftreten eines geänderten Rotamers am C-terminalen Isoleucin²², das aus der Flexibilität des C-Terminus resultiert. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass beide in vorigen Strukturen beobachtete Rotamere von Arg¹⁸ auftraten. Es scheint denkbar, dass diese Rotamere über eine niedrige Energiebarriere leicht ineinander übergehen und die alternativen Rotamere von Arg¹⁸ nicht zwingend eine Folge der Variation der Peptidsequenz auftritt. Die Anordnung der Ribose konnte in beiden Strukturen nicht verglichen werden, da sie durch eine Fehlordnung in der Elektronendichte nicht charakterisiert ist.

Nachdem die durch Bindung des Fasudils induzierten Effekte in der Proteinstruktur im Vergleich zum PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-Komplex bestimmt wurden, konnte die Einführung der Boronsäure-Fasudile BFS und BFF betrachtet werden.

In Abbildung 54 ist ein Vergleich der Strukturen von PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² mit Fasudil, BFS und BFF gezeigt.

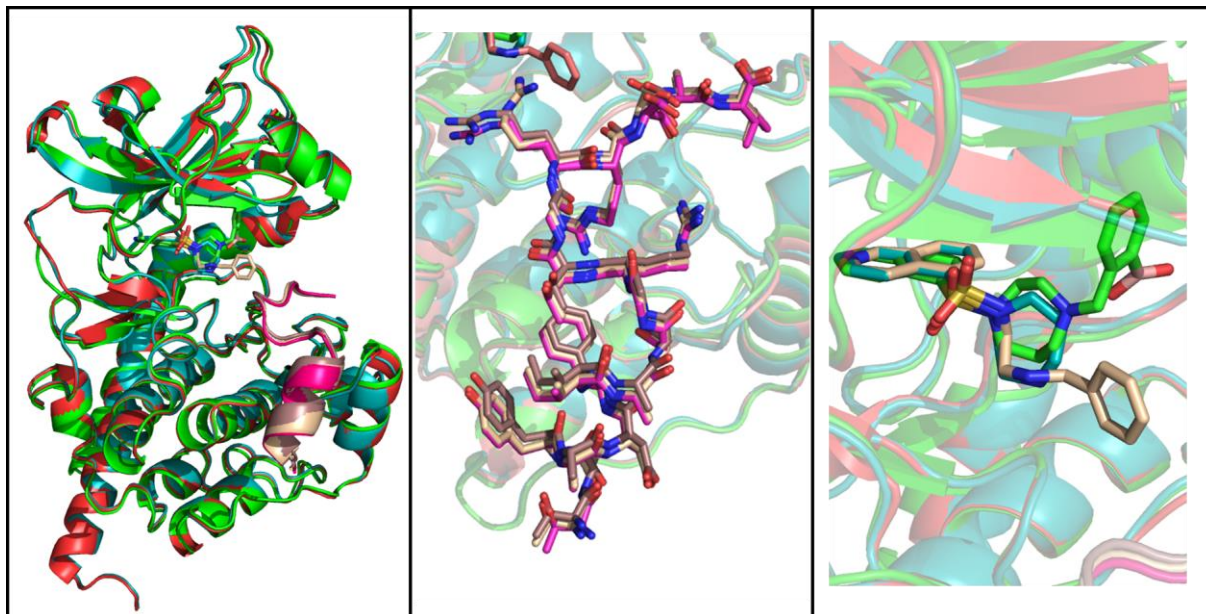


Abbildung 54: Links gezeigt ist die Überlagerung der Cartoon-Darstellung der Komplexstrukturen von PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-Fasudil (PKA türkis, Peptid lila, PDB-Code: 5O0E), PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-BFS (PKA grün, Peptid braun, PDB-Code: 5O5M) und PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-BFF (PKA rot, Peptid beige, PDB-Code: 5O0E). Fasudil, BFS und BFF sind in der Stick-Darstellung gezeigt. In der Mitte ist eine Ausschnittsvergrößerung der überlagerten Peptide in Stick-Darstellung gezeigt. Rechts ist eine Überlagerung von Fasudil, BFS und BFF in Stick-Darstellung gezeigt.

Es zeigte sich, dass hinsichtlich der Konformation der PKA nur eine geringe Verschiebung des Glycin-reichen *Loops* weg vom PKI-Peptid stattfindet, wenn eine Phenylboronsäure angefügt wird oder der 1,4-Homopiperazin-Ring des Fasudils aufgeschnitten wird. Dies liegt vermutlich am größeren sterischen Anspruch der strukturell erweiterten Fasudil-Derivate. Auch in diesen Komplexen lagen die Ribose-Bausteine des PKIs fehlgeordnet vor, sodass hier keine Aussage über deren genaue Orientierung im Komplex gemacht werden konnte. In der Orientierung der Fasudil-Derivate tritt bei Einführung der Phenylboronsäure in BFS eine schwache Verschiebung des 1,4-Homopiperazin-Ringes auf und die Phenylboronsäure zeigt in Richtung des Glycin-reichen *Loops*. Bei Aufschneiden des 1,4-Homopiperazin-Ringes in BFF orientiert sich die Kohlenstoffkette größtenteils analog der Propylenkette des ursprünglichen 1,4-Homopiperazin-Ringes. Die Phenylboronsäure von BFF zeigt in Richtung der PKI-Bindetasche, in die Nähe von Arg¹⁸ des Peptides.

Die Boronsäure ist jedoch fehlgeordnet, sodass keine Aussage über möglicherweise eingegangene Wasserstoffbrückenbindungen getroffen werden können. Die Interaktion von BFS mit dem Protein und die Ausrichtung von BFF sind in Abbildung 55 gezeigt.

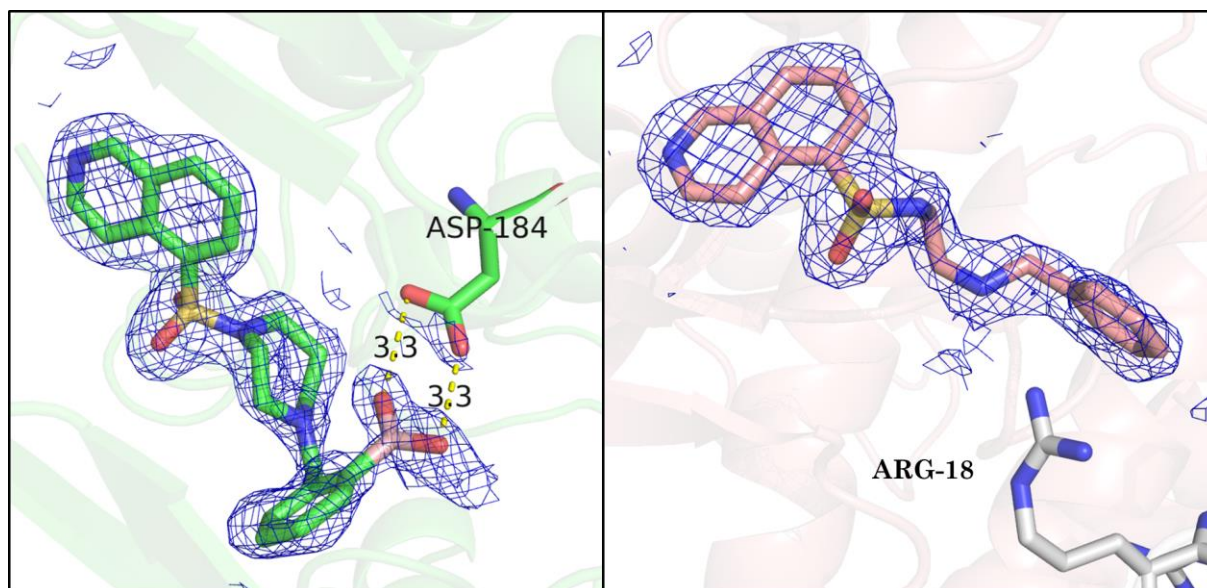


Abbildung 55: Links gezeigt ist die Orientierung von BFS in der PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-BFS-Komplex-Struktur (PKA in Cartoon-Darstellung grün, BFS und Asp¹⁸⁴ in Stick-Darstellung. In der Stick-Darstellung sind Kohlenstoffe grün gefärbt. PDB-Code: 5O5M). Rechts gezeigt ist die Orientierung von BFF in der PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-BFF-Komplex-Struktur (PKA in Cartoon-Darstellung rot, BFF und Arg¹⁸ in Stick-Darstellung. In der Stick-Darstellung sind Kohlenstoffe des Proteins rot und Kohlenstoffe des Peptids beige gefärbt. PDB-Code: 5O0E). Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt.

Obwohl die Ribosen fehlgeordnet vorliegen, kann der Schluss gezogen werden, dass keine Verknüpfung mit den Phenylboronsäuren stattfindet. Eine solche Verknüpfung hätte eine deutliche Fixierung der Ribose und damit reduzierte Flexibilität zur Folge. Wäre ein Komplex gebildet worden, so wäre dieser höchstwahrscheinlich genau definiert gewesen. BFF könnte zwar durch eine Drehung der Phenylboronsäure in Richtung der Ribose orientiert werden, dies scheint jedoch ungünstig zu sein.

6.4.4 Versuche zur Verknüpfung von PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²² mit Boronsäure-Fasudilen

Für den Komplex aus PKA und PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²² konnte keine Struktur erhalten werden. Deshalb war es nicht möglich, die ligandeninduzierten Effekte bei Einführung von Fasudil zu beurteilen.

Jedoch konnten Strukturen für die Komplexe aus PKA-PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²²-Fasudil PKA-PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²²-BFS und PKA-PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²²-BFF erhalten werden, weshalb Aussagen über die Verknüpfung der Ribosen und Boronsäuren und der Effekte der Derivatisierung von Fasudil gemacht werden konnten. Der Vergleich der Strukturen ist in Abbildung 56 gezeigt.

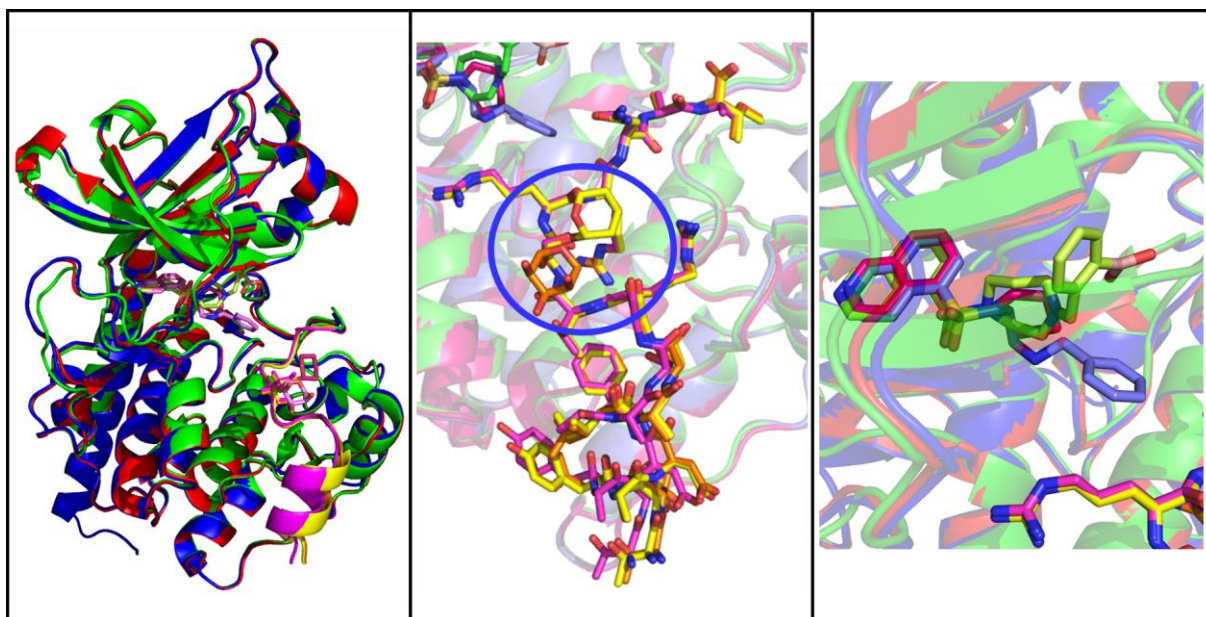


Abbildung 56: Links gezeigt ist die Überlagerung der Cartoon-Darstellung der Komplexstrukturen von PKA-PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²²-Fasudil (PKA rot, Peptid gelb, PDB-Code: 6ERS), PKA-PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²²-BFS (PKA grün, Peptid lila, PDB-Code: 6EMD) und PKA-PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²²-BFF (PKA blau, Peptid orange, PDB-Code: 5O0E) Fasudil, BFS und BFF sind in der Stick-Darstellung gezeigt. In der Mitte ist eine Ausschnittsvergrößerung der überlagerten Peptide in Stick-Darstellung gezeigt. Hervorgehoben in blau ist der Ort der Ribose. Rechts ist eine Überlagerung von Fasudil, BFS und BFF in Stick-Darstellung gezeigt.

Durch Derivatisierung des Fasudils tritt keine Änderung in der Konformation der PKA ein. Bei den Peptiden kommt es in Komplex mit BFS zu einer leichten Verschiebung der Helix in Richtung der PKA. Die Ribose liegt in allen drei Komplexen unterschiedlich vor. In der Komplexstruktur mit Fasudil zeigt die Ribose in Richtung von Arg¹⁸, ist teilweise fehlgeordnet und geht keine Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein oder Peptid ein. Denkbar wären Wasserstoffbrücken der Hydroxygruppen der Ribose mit Arg¹⁵, diese konnten jedoch aufgrund der teilweise fehlgeordneten Ribose nicht nachgewiesen werden. In der Komplexstruktur mit BFS liegt die Ribose vollständig fehlgeordnet vor und das Riboserin ist nur bis zu den Atomen des Serins sichtbar.

In der Komplexstruktur mit BFF lässt sich die Ribose vollständig in der Elektronendichte wiederfinden, jedoch liegt sie in einer anderen Konformation als in der Komplexstruktur mit Fasudil vor. In der Komplexstruktur mit BFF orientiert sich die Ribose in die entgegengesetzte Richtung wie beim Komplex mit Fasudil. Auch in diesem Fall geht die Ribose keine Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein oder Peptid ein. Fasudil und die Fasudil-Derivate BFS und BFF liegen in denselben Bindungsmodi vor wie in den Komplexen mit PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²; bei Einführung der Phenylboronsäure in BFS wird der 1,4-Homopiperazin-Ring leicht verschoben und in Richtung des Glycin-reichen *Loops* ausgerichtet. Wird der 1,4-Homopiperazin-Ring aufgeschnitten, so richtet sich die Phenylboronsäure in Richtung des Peptides aus. In BFF liegt die terminale Boronsäure allerdings fehlgeordnet vor, weshalb möglicherweise ausgebildete Wasserstoffbrückenbindungen nicht charakterisiert werden können. In Abbildung 56 ist die Interaktion von BFS mit der PKA, die Ausrichtung von BFF, sowie eine genauere Darstellung der Ribosen gezeigt.

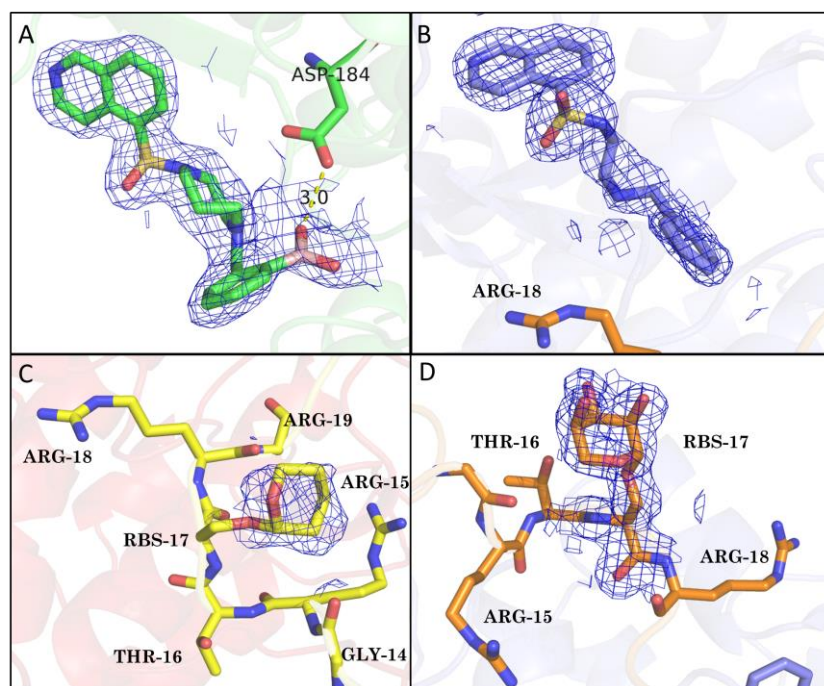


Abbildung 57: A: Orientierung von BFS in der PKA-PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²²-BFS-Komplex-Struktur (PKA als Cartoon grün, BFS und Asp¹⁸⁴ als Stick-Darstellung grün, PDB-Code: 6EMD). B: Orientierung von BFF in der PKA-PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²²-BFF-Komplex-Struktur (PKA als Cartoon blau, BFF als Stick blau, Peptid als Stick orange, PDB-Code: 6EME). C: Umgebung der Ribose in der PKA-PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²²-Fasudil-Komplex-Struktur (PKA als Cartoon-Darstellung rot, Peptid als Stick gelb, PDB-Code: 6ERS). D: Umgebung der Ribose in der PKA-PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²²-BFF-Komplex-Struktur (PKA als Cartoon-Darstellung blau, Peptid als Stick orange, PDB-Code: 6EME). Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt.

Es wurde ersichtlich, dass die G17RBS-Variation nicht geeignet zur Verknüpfung von Peptid- und ATP-Bindetasche war. Die Ribose ist zu weit entfernt von der ATP-Bindetasche, zeigt in der Komplexstruktur mit BFF sogar in die entgegengesetzte und kann keinerlei Interaktion mit einem *hinge*-Binder eingehen.

6.4.5 Versuche zur Verknüpfung von PKI(RBS²¹)⁵⁻²² mit Boronsäure-Fasudilen

Für die Komplexe aus PKA-PKI(RBS²¹)⁵⁻²² und PKA-PKI(RBS²¹)⁵⁻²²-Fasudil konnten keine Strukturen erhalten werden, da die erhaltenen Kristalle nur suboptimale Qualität aufwiesen. Deshalb können die ligandeninduzierten Effekte durch Einführung des Peptides beziehungsweise durch Einführung von Fasudil in PKA-PKI(RBS²¹)⁵⁻²²-Komplexe nicht beurteilt werden. Für die Komplexe PKA-PKI(RBS²¹)⁵⁻²²-BFS und PKA-PKI(RBS²¹)⁵⁻²²-BFF konnten Strukturen erhalten werden. Der Vergleich dieser Strukturen ist in Abbildung 58 gezeigt.

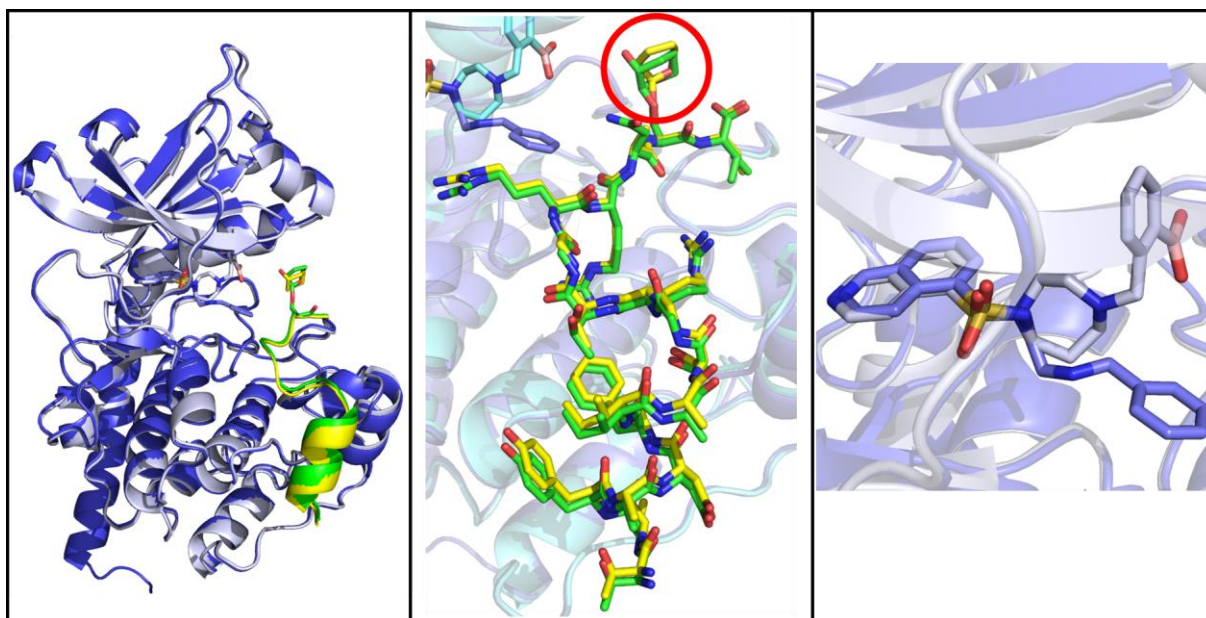


Abbildung 58: Links gezeigt ist die Überlagerung der Cartoon-Darstellung der Komplexstrukturen von PKA-PKI(RBS²¹)⁵⁻²²-BFS (PKA hellblau, Peptid gelb, PDB-Code: 5OT3) und PKA-PKI(RBS²¹)⁵⁻²²-BFF (PKA blau, Peptid grün, PDB-Code: 5OUC), BFS und BFF sind in der Stick-Darstellung gezeigt. In der Mitte ist eine Aussichtsvergrößerung der überlagerten Peptide in Stick-Darstellung gezeigt. Die Ribosen sind in rot hervorgehoben. Rechts ist eine Überlagerung von BFS und BFF in Stick-Darstellung gezeigt.

Auch in diesen Komplexen zeigte sich, dass durch den Austausch von BFS gegen BFF keine Änderung in der Konformation der PKA auftritt. Die Orientierung des Peptides bleibt ebenfalls größtenteils gleich. In beiden Komplexstrukturen liegt die Ribose zum Teil fehlgeordnet vor und nimmt eine leicht unterschiedliche Orientierung des Ringes ein. Auch in diesen Strukturen geht die Ribose keine Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Peptid oder dem Protein ein. Die Orientierung von BFS und BFF ist ebenfalls analog zu den vorher untersuchten Komplexen. BFS sorgt für eine Auslenkung des 1,4-Homopiperazin-Rings und daher orientiert sich die Boronsäuregruppe in Richtung des Glycin-reichen *Loops*, während in BFF die gleiche Gruppe vermutlich in Richtung des Peptides zeigt. Die polare Interaktion der Phenylboronsäure in BFF konnte allerdings nicht gesichert nachgewiesen werden, da die Boronsäure fehlgeordnet vorlag. Die Interaktion dieser Gruppe in BFS konnte allerdings ermittelt werden. In Abbildung 59 ist die Interaktion der Boronsäure von BFS mit der PKA, die Ausrichtung von BFF, sowie eine genauere Darstellung der Ribose in den Peptiden gezeigt.

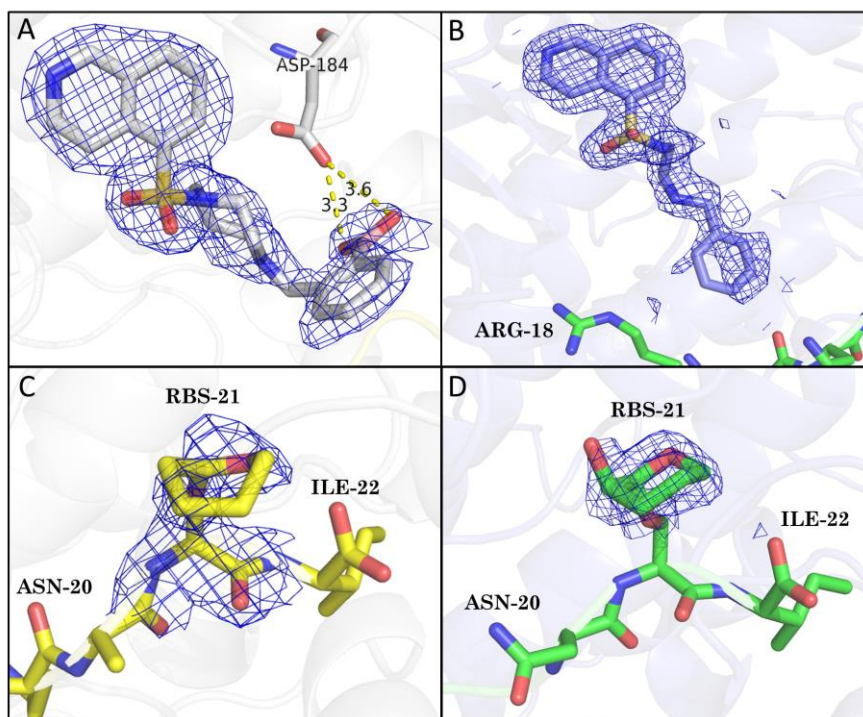


Abbildung 59: A: Orientierung von BFS in der PKA-PKI(RBS²¹)⁵⁻²²-BFS-Komplex-Struktur (PKA als Cartoon hellblau, BFS und Asp¹⁸⁴ als Stick, PDB-Code: 5OT3). B: Orientierung von BFF in der PKA-PKI(RBS²¹)⁵⁻²²-BFF-Komplex-Struktur (PKA als Cartoon blau, BFF als Stick, Peptid als Stick grün, PDB-Code: 5OUC). C: Umgebung der Ribose in der PKA-PKI(RBS²¹)⁵⁻²²-BFS-Komplex-Struktur (PKA als Cartoon hellblau, Peptid als Stick gelb, PDB-Code: 5OT3). D: Umgebung der Ribose in der PKA-PKI(RBS²¹)⁵⁻²²-BFF-Komplex-Struktur (PKA als Cartoon blau, Peptid als Stick grün, PDB-Code: 5OUC). Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt.

Auch in diesem Komplex bildet die Boronsäuregruppe in BFS eine schwache Wasserstoffbrückenbindung von 3,3 Å mit Asp¹⁸⁴ der PKA aus. Da die Phenylboronsäure jedoch geringfügig in Richtung des Peptides verschoben ist, wird die Interaktion der zweiten Hydroxygruppe der Boronsäure mit Asp¹⁸⁴ mit 3,6 Å zu lang für eine echte Wasserstoffbrückenbindung. Bei Betrachtung des Abstandes zwischen Boronsäure und Ribose in der PKA-PKI(RBS²¹)⁵⁻²²-BFS-Komplex-Struktur wird auf den ersten Blick deutlich, dass die beide Komponenten in unmittelbarer Nachbarschaft liegen, jedoch nicht miteinander in Interaktion treten. Die Position 21 des Peptides scheint von der Orientierung der Ribose her grundsätzlich geeignet für die Verknüpfung mit der ATP-Bindetasche zu sein. Jedoch scheint eine Verknüpfung mit der Boronsäure ungünstig zu sein; beim Übergang zu einem anderen Rotamer Riboserins könnte die Ribose in Kontakt mit der Boronsäure treten. Jedoch wären hierbei die Geometrien beider Partner zueinander ungünstig. Die Ribose nimmt höchstwahrscheinlich die in den Kristallstrukturen beobachtete Orientierung ein, damit sie einen möglichst großen Abstand zu der Boronsäuregruppe einnimmt. Somit scheint, wie bei den Komplexierungsversuchen von PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² mit den Boronsäure-Fasudilen, eher ein sterischer Konflikt als eine energetisch günstige Interaktion aufzutreten.

6.5 Ligandeninduzierte Effekte auf Peptide durch Einführung von Fasudil-Derivaten

6.5.1 Allgemein

Im Rahmen der ersten Kristallisationsversuche wurden vier, vom Ort der Variation her als geeignet bewertete, PKI⁵⁻²²-Varianten bestimmt. Die Ausbildung von *Self-Assembly*-Komplexen dieser Peptide mit Boronsäure-Fasudilen konnte jedoch nicht beobachtet werden. Zum Design neuer potentieller PKI⁵⁻²²-Varianten und Boronsäure-Fasudilen mussten jedoch auch möglicherweise auftretende ligandeninduzierte Effekte der Fasudil-Derivate auf andere, auf den ersten Blick ungeeignete PKI⁵⁻²²-Varianten berücksichtigt werden. Deshalb wurden auch die von der Art der Variation ungeeigneten PKI⁵⁻²²-Variationen PKI(RBS¹³)⁵⁻²², PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²², PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² und das nicht variierte PKI⁵⁻²² in Komplex mit der PKA und den *hing*-Bindern Fasudil, BFS und BFF kristallisiert.

6.5.2 Ligandeninduzierte Effekte auf PKI⁵⁻²² durch Einführung von Fasudil-Derivaten

Wie bereits bei der Serie der an günstigen Positionen variierten PKI⁵⁻²²-Derivaten, mussten zuerst die Änderungen bestimmt werden, die bei Einführung von Fasudil auftreten, bevor die ligandeninduzierten Effekte der Boronsäure-Fasudile beurteilt werden konnten. In Abbildung 60 ist der Vergleich der Komplexstrukturen von PKA-PKI⁵⁻²² und PKA-PKI⁵⁻²²-Fasudil gezeigt.

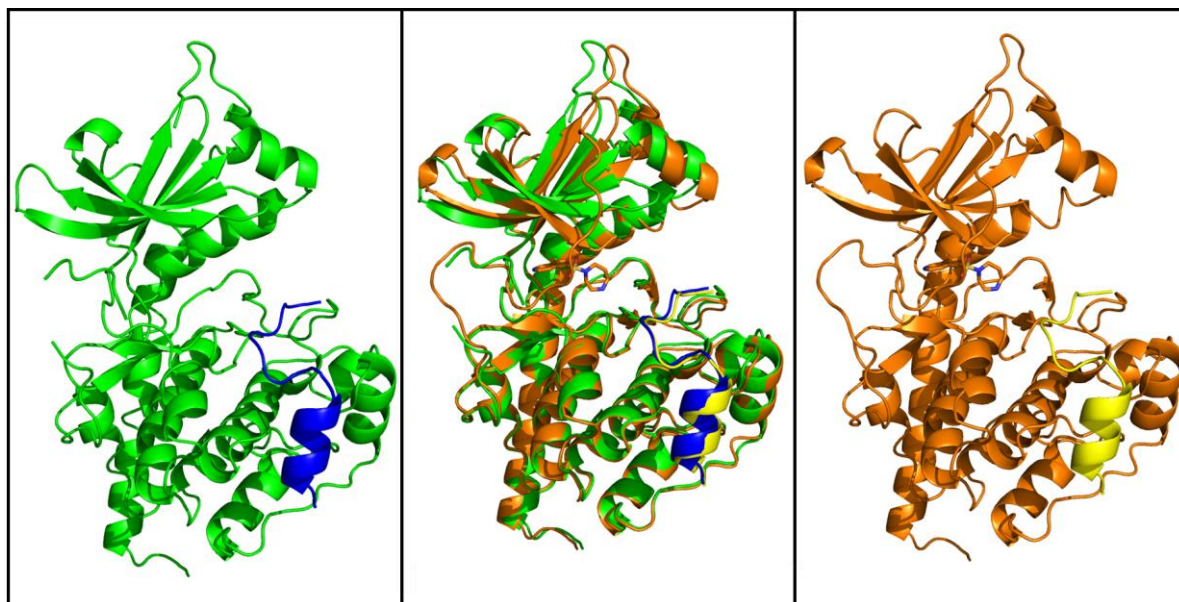


Abbildung 60: Vergleich der Komplexstrukturen in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI⁵⁻²² (links, PKA grün, Peptid blau, PDB-Code: 6ERV) und PKA-PKI⁵⁻²²-Fasudil (rechts, PKA orange, Peptid gelb, PDB-Code: 6ERW). In der Mitte ist die Überlagerung beider Kristallstrukturen gezeigt. Fasudil ist in allen Darstellungen orange in der Stick-Darstellung gezeigt

Wie bereits in allen zuvor diskutierten Peptid-Serien zeigte sich, dass bei Bindung von Fasudil im PKA-PKI⁵⁻²²-Komplex eine Verschiebung des Glycin-reichen-*Loops* in Richtung des Peptides auftritt. Weiterhin wird das Peptid geringfügig weg von der *hinge*-Region verschoben. Der Trend, der in allen variierten Peptid-Serien auftrat, konnte somit auch im nativen PKI⁵⁻²² festgestellt werden. Eine genauere Untersuchung der Peptid-Seitenketten ist in Abbildung 61 gezeigt.

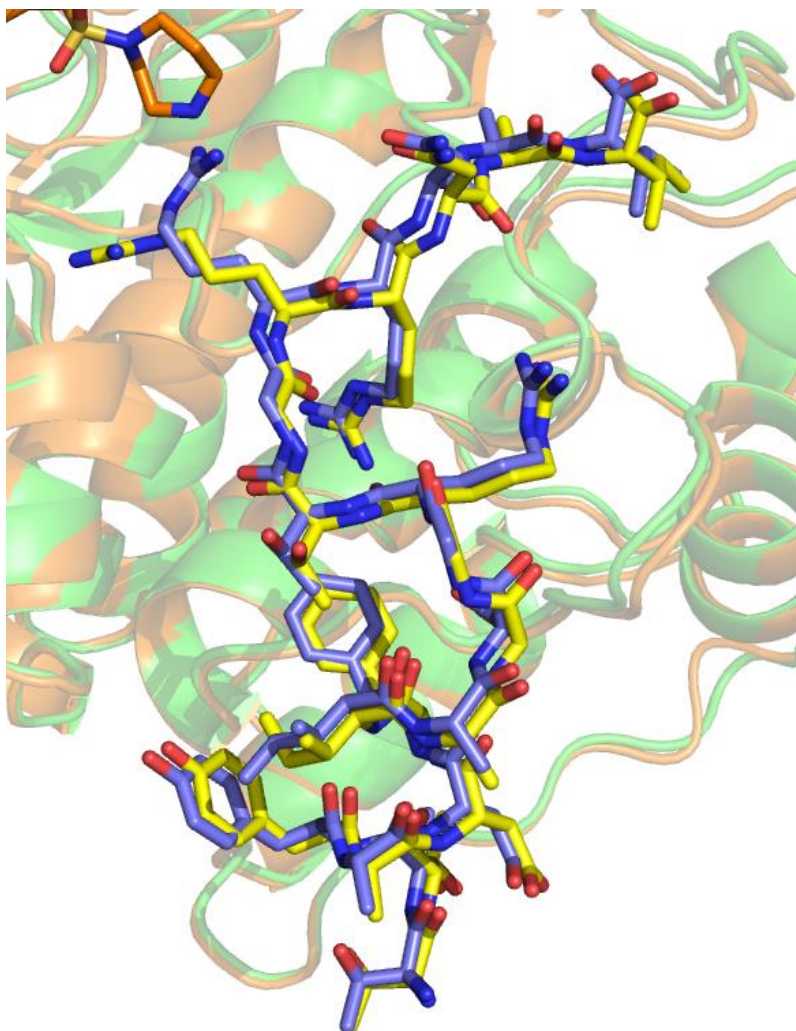


Abbildung 61: Vergleich der Orientierung von PKI⁵⁻²² in den Komplexstrukturen PKA-PKI⁵⁻²² (PKA in der Cartoon-Darstellung grün, Peptid in der Stick-Darstellung blau, PDB-Code: 6ERV) und PKA-PKI⁵⁻²²-Fasudil (PKA in der Cartoon-Darstellung orange, Peptid in der Stick-Darstellung gelb, PDB-Code: 6ERW). Fasudil ist in der Stick-Darstellung gezeigt, wobei die Kohlenstoffe orange gefärbt sind.

Bei genauerer Betrachtung der PKI⁵⁻²²-Seitenketten wurde ersichtlich, dass die meisten Seitenketten nur eine geringfügige Verschiebung weg von der *hinge*-Region aufwiesen, die Orientierung des Peptids jedoch in beiden Strukturen gleich blieb. Der einzige bemerkenswerte Unterschied war das Auftreten eines alternativen Rotamers für Arg¹⁸. Da jedoch bereits in mehreren Strukturen das Auftreten des Rotameren-Wechsels unabhängig von der Variation des Peptides oder des hinzugegebenen Liganden zu beobachten war, wurde der Wechsel nicht als ligandeninduzierter Effekt, sondern nur als unabhängig auftretende alternative Konformation beurteilt, die bei leicht anderen Kristallisationsbedingungen alternativ populierte wird.

Nachdem die durch Einführung von Fasudil auftretenden Effekte bestimmt wurden, konnte die Einführung der Boronsäure-Fasudile BFS und BFF betrachtet werden. In Abbildung 62 ist ein Vergleich der Strukturen von PKA-PKI⁵⁻²² mit Fasudil, BFS und BFF gezeigt.

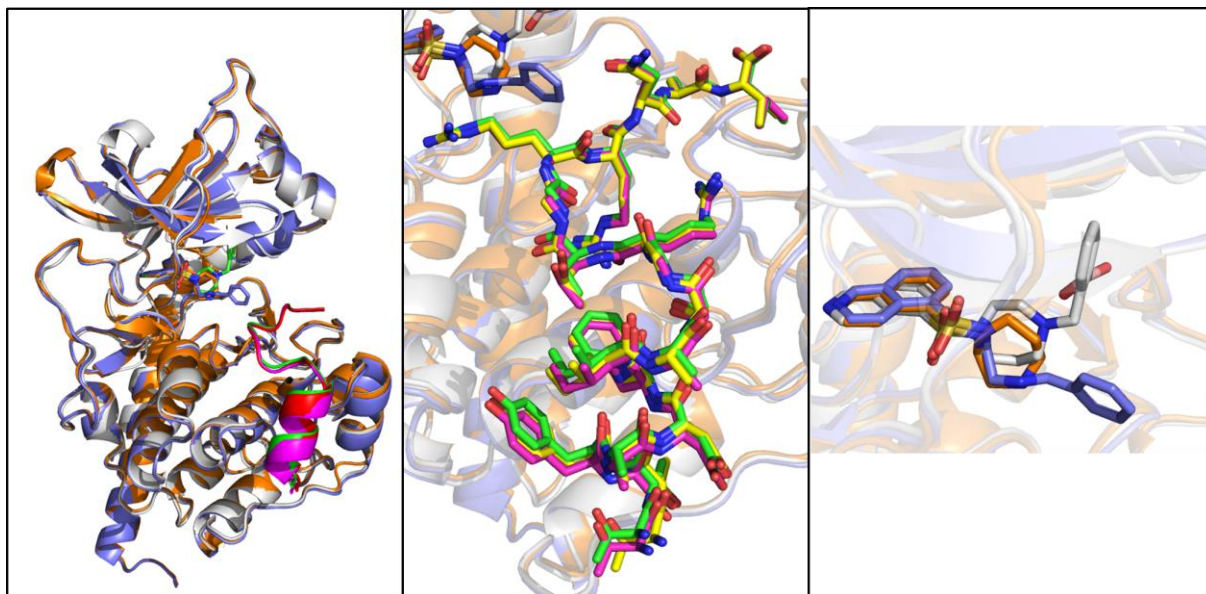


Abbildung 62: Links gezeigt ist die Überlagerung der Cartoon-Darstellung der Komplexstrukturen von PKA-PKI⁵⁻²²-Fasudil (PKA orange, Peptid gelb, PDB-Code: 6ERW), PKA-PKI⁵⁻²²-BFS (PKA grau, Peptid grün, PDB-Code: 5OL3) und PKA-PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²²-BFF (PKA blau, Peptid lila, PDB-Code: 5OTG). Fasudil, BFS und BFF sind in der Stick-Darstellung gezeigt. In der Mitte ist eine Ausschnittsvergrößerung der überlagerten Peptide in Stick-Darstellung gezeigt. Rechts ist eine Überlagerung von Fasudil, BFS und BFF in Stick-Darstellung gezeigt.

Wie bereits in vorigen Serien tritt bei der Derivatisierung des Fasudils keine Änderung der Konformation von Peptid und Protein auf. Die Ausrichtung der Fasudil-Derivate war auch hierbei analog zu den vorigen Serien, in BFF ist die Boronsäuregruppe in Richtung des Peptides, in BFS in Richtung des Glycin-reichen *Loops* orientiert. Da die Boronsäuregruppe in BFF fehlgeordnet vorliegt, konnte keine Aussage über die polaren Interaktionen mit dem Protein gemacht werden. Die Interaktion von BFS mit dem Protein, sowie die Ausrichtung von BFF sind in Abbildung 63 gezeigt.

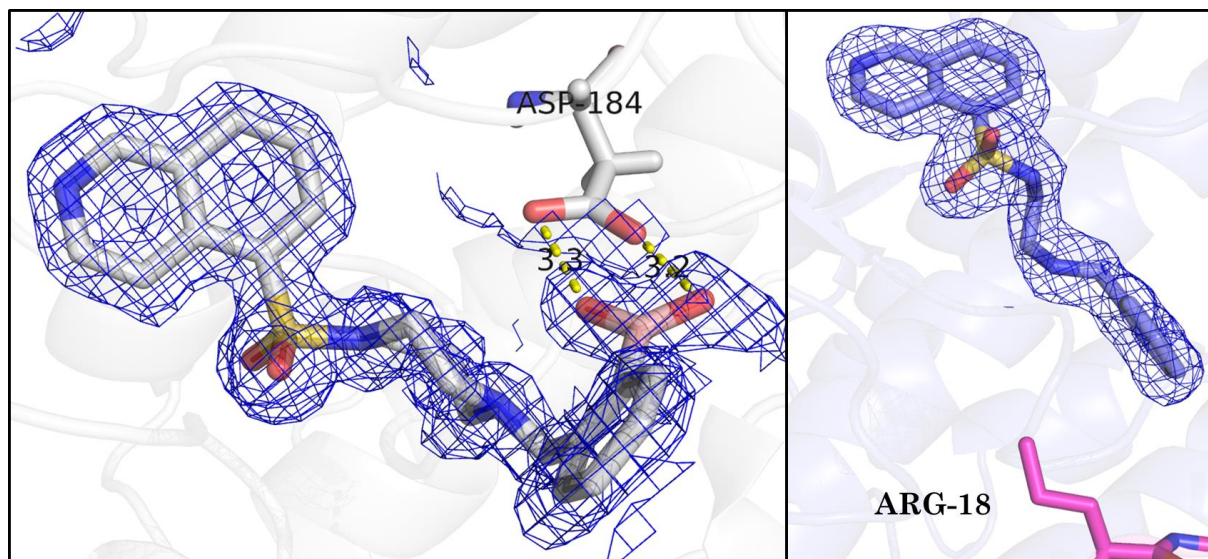


Abbildung 63: Links ist die Orientierung von BFS in der PKA-PKI⁵⁻²²-BFS-Komplex-Struktur (PKA als Cartoon grau, BFS und Asp¹⁸⁴ als Stick-Darstellung grau, PDB-Code: 5OL3) gezeigt. Rechts ist die Orientierung von BFF in der PKA-PKI⁵⁻²²-BFF-Komplex-Struktur (PKA als Cartoon blau, BFF als Stick blau, Peptid als Stick lila, PDB-Code: 5OTG). Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt.

Die ligandeninduzierten Effekte auf Protein und Peptid durch gemeinsame Kristallisation von Fasudil und den Fasudil-Derivaten ist somit für das native PKI⁵⁻²² analog wie bei allen bisher diskutierten Variationen.

6.5.3 Ligandeninduzierte Effekte auf PKI(RBS¹³)⁵⁻²² durch Einführung von Fasudil-Derivaten

Für die Variation PKI(RBS¹³)⁵⁻²² konnten neben der Kristallstruktur ohne Zugabe von *hinge*-Bindern nur die Struktur von PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-BFS erhalten werden. Die Komplexe PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-Fasudil und PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-BFF kristallisierten nur in Form von dünnen Nadeln, an denen keine brauchbaren Datensätze gesammelt werden konnten.

Selbst bei Erniedrigung der Methanol-Konzentrationen in den Kristallisationsansätzen und Zugabe von Kristallisationskeimen mittels *Seeding* konnten keine besseren Kristalle erhalten werden. Somit ließ sich für die Variante PKI(RBS¹³)⁵⁻²² nur der ligandeninduzierte Effekt der Zugabe von BFS bestimmen. Ein Vergleich der Strukturen ist in Abbildung 64 gezeigt.

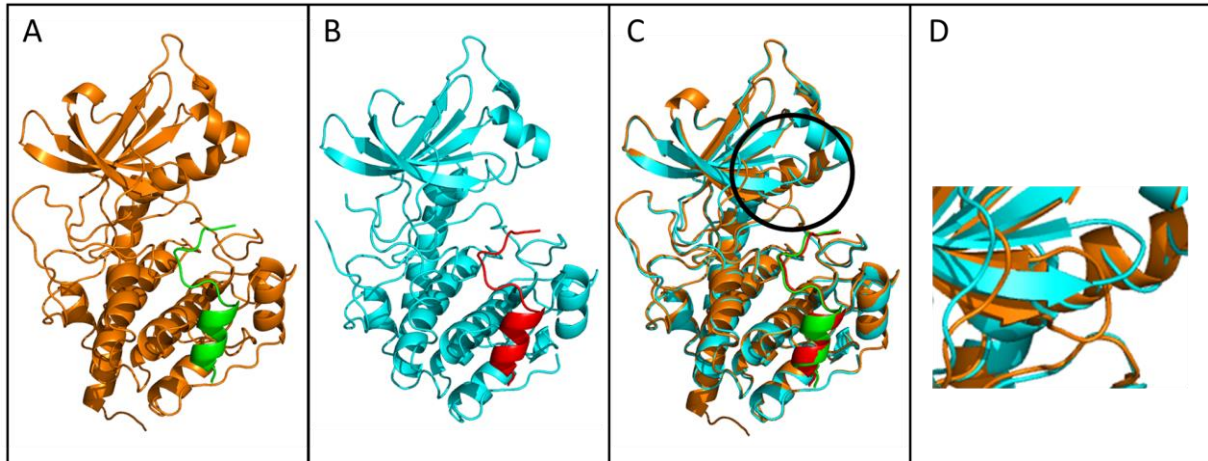


Abbildung 64: A: Komplexstruktur in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²² (PKA orange, Peptid grün, PDB-Code: 5OUA) B: Komplexstruktur von PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-BFS (PKA türkis, Peptid rot, PDB-Code: 6EGW).

C: Überlagerung beider Kristallstrukturen, in schwarz ist der Glycin-reiche *Loop* hervorgehoben.

D: Ausschnittsvergrößerung des Glycin-reichen *Loops*.

Bei der Einführung von BFS in den PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-Komplex tritt ein signifikanter ligandeninduzierter Effekt ein. Im Gegensatz zu den meisten Serien, in denen der Glycin-reiche *Loop* ohne *hinge*-Binder eine geringfügig größere Entfernung vom Peptid aufweist als in Gegenwart eines *hinge*-Binders, wird bei diesem Peptid der Glycin-reiche *Loop* deutlich vom Peptid weggeschoben. Ebenfalls wird das Peptid in den meisten Beispielen bei Einführung eines *hinge*-Binders leicht weg von der *hinge*-Region geschoben, während das Peptid hier keine Verschiebung aufweist. Auch wenn keine Struktur des PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-Fasudil-Komplexes erhalten werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass der ligandeninduzierte Effekt nicht erst durch das strukturell vergrößerte BFS, sondern bereits in Gegenwart des kleineren Fasudils eintreten würde. In der Struktur des PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-Komplexes liegt der Glycin-reiche *Loop* in einer Konformation vor, in der er die ATP-Bindetasche zum größten Teil verschließt. Wird ein *hinge*-Binder eingeführt, so kann diese geschlossene *Loop*-Konformation nicht eingenommen werden, da ein sterischer Konflikt zwischen dem Liganden und dem Glycin-reichen *Loop* auftreten würde. Die im PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-Komplex beobachtete Konformation des Glycin-reichen *Loops* scheint somit eine Konsequenz der Präsenz der *hinge*-Binder zu sein. In Abbildung 65 ist eine genauere Analyse der Peptid-Orientierung und BFS-Orientierung gezeigt.

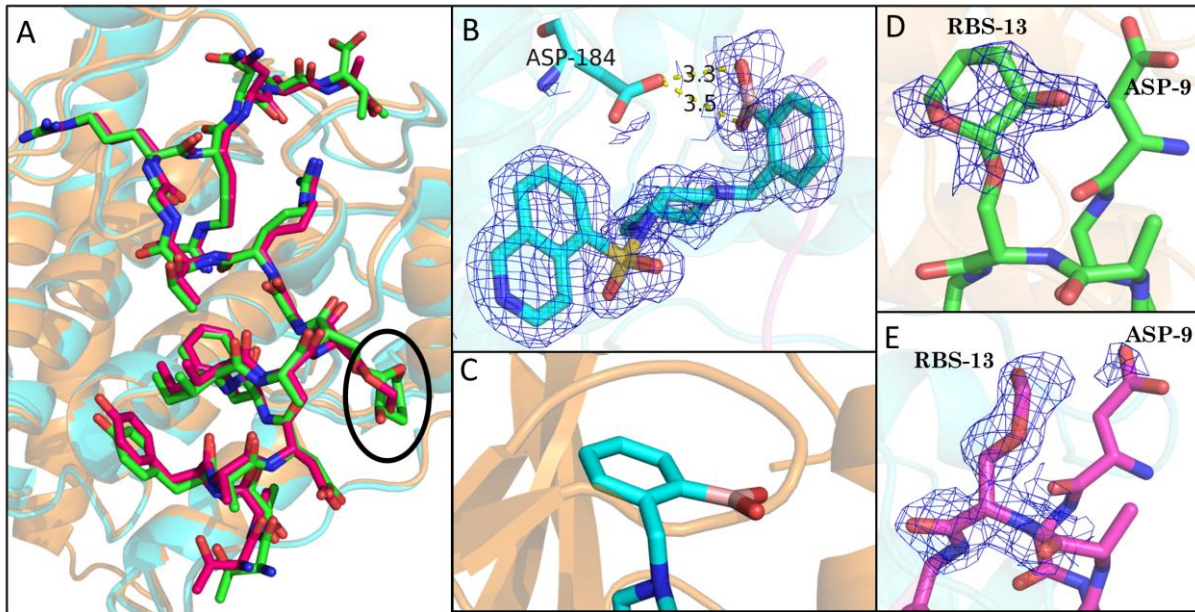


Abbildung 65: A: Überlagerung der Peptid-Orientierung in der PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-Komplex-Struktur (PKA in Cartoon-Darstellung orange, Peptid in Stick-Darstellung grün, PDB-Code: 5OUA) mit der PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-BFS-Komplex-Struktur (PKA in Cartoon-Darstellung türkis, BFS und Peptid in Stick-Darstellung, Peptid mit lila und BFS mit hellblau gefärbten Kohlenstoffen, PDB-Code: 6EGW), Ribose hervorgehoben in schwarz. B: Orientierung von BFS in der PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-BFS-Komplex-Struktur gezeigt (Einfärbung identisch zu links). C: Orientierung von BFS in der PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-BFS-Komplex-Struktur überlagert mit der Orientierung des Glycin-reichen Loops in PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-Komplex-Struktur gezeigt. D: Ribose in der PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-Komplex-Struktur E: Ribose in der PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-BFS-Komplex-Struktur. Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt.

Wie bereits erwähnt und in Abbildung 66 mittig gezeigt, würden Glycin-reicher *Loop* aus PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-Komplex-Struktur und BFS aus PKA-PKI(RBS¹³)⁵⁻²²-BFS-Komplex-Struktur miteinander in sterischen Konflikt treten. In diesem Fall ist somit ein ligandeninduzierter Effekt erforderlich, der eine Öffnung der ATP-Bindetasche durch Verschieben des Glycin-reichen Loops ermöglicht. Dieser ligandeninduzierte Effekt ist jedoch leider nicht für das Design neuer PKI⁵⁻²²-Varianten oder Fasudil-Derivate zur Ausbildung von *Self-Assembly*-Komplexen verwendbar.

6.5.4 Ligandeninduzierte Effekte auf PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²² durch Einführung von Fasudil-Derivaten

Für die Komplexe aus PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²², PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-Fasudil und PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-BFS konnten Kristallstrukturen erhalten werden. Für die Kristalle von PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-BFF konnten dagegen keine Datensätze gesammelt werden, da sie größtenteils als dünne Platten kristallisierten, die nur in zwei Raumdimensionen ausreichende Größe aufwiesen. In den ersten Versuchen trat eine solche Plattenbildung auch für die Komplexe aus PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-BFS auf, durch Erhöhung der Methanol-Konzentration in den Kristallisationsansätzen von 15-20 % v/v auf 18-23 % v/v konnten die Morphologie der Kristalle jedoch zu einer besser geeigneten, stärker isometrischen Form geändert werden.

Aufgrund der schlechten Qualität der PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-Komplex-Struktur konnte nur ein grober Vergleich der PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²- und PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-Fasudil-Strukturen durchgeführt werden; wichtige Bereiche, wie beispielsweise der Glycin-reiche *Loop* liegen in der PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-Struktur fehlgeordnet vor. In Abbildung 66 ist ein Vergleich der Strukturen gezeigt.

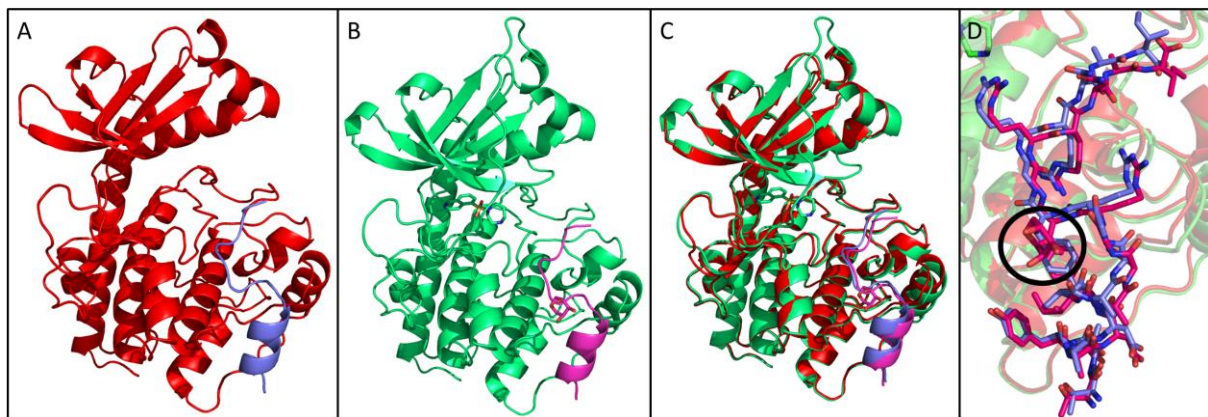


Abbildung 66: A: Komplexstruktur in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²² (PKA rot, Peptid blau, nicht in der RSCPDDB hinterlegt) B: Komplexstruktur in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-Fasudil (PKA grün, Peptid lila, PDB-Code: 6EMB). C: Überlagerung der beiden Komplexstrukturen. D: Überlagerung der Stick-Darstellung der Peptide. In schwarz hervorgehoben ist die Ribose.

Bei Vergleich der Strukturen zeigte sich, dass eine Verschiebung des Peptides weg von der *hinge*-Region stattfindet. Dieser Trend wurde bereits bei den anderen Peptiden beobachtet und ist somit nicht überraschend.

Da sowohl der Glycin-reiche *Loop* als auch die Ribose in der Struktur ohne Fasudil vollständig fehlgeordnet vorliegen, konnte kein weiterer Vergleich durchgeführt werden.

Zur Beurteilung von ligandeninduzierten Effekten durch die Derivatisierung von Fasudil wurden die Strukturen von PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-Fasudil und PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-BFS verglichen. Es zeigte sich bereits vor Betrachtung der Struktur, dass eine Änderung der Kristallpackung auftrat. Die Raumgruppe und Einheitszelle veränderten sich von P₂₁2₁2₁ und a = 58,96 Å, b = 73,89 Å, c = 108,20 Å, α = β = γ = 90 ° in der Struktur mit Fasudil auf P₄₁ auf a = 83,73 Å, b = 83,73 Å, c = 60,27 Å, α = β = γ = 90 °. Die Überlagerung der Strukturen ist in Abbildung 67 gezeigt.

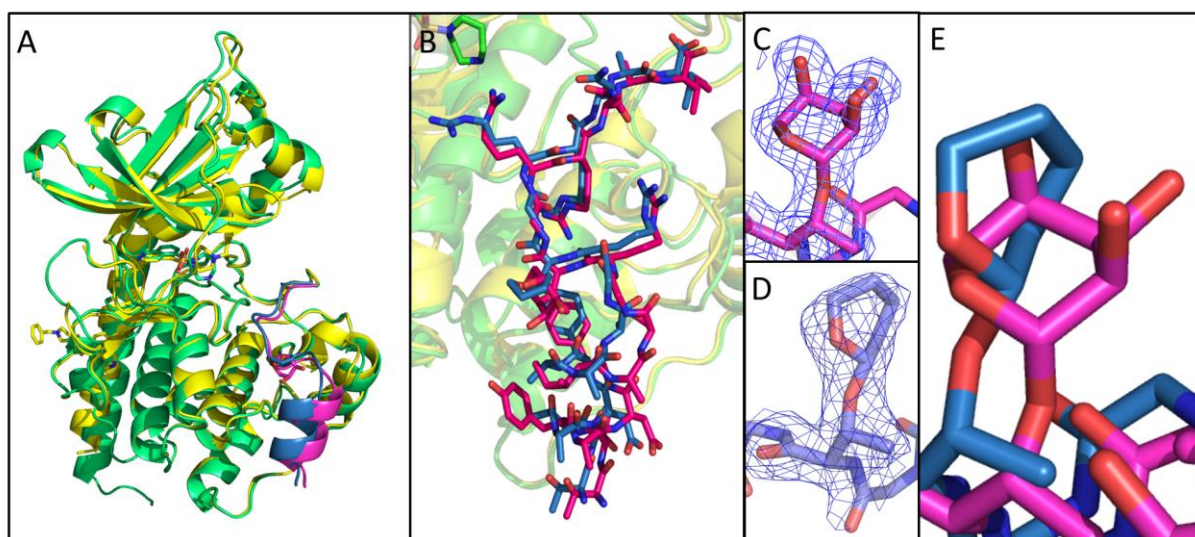


Abbildung 67: A: Überlagerung der Komplexstrukturen in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-Fasudil (PKA grün, Peptid lila, PDB-Code: 6EMB) und PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-BFS (PKA gelb, Peptid blau, PDB-Code: 6EMC). B: Überlagerung beider Kristallstrukturen mit Ausschnittsvergrößerung der Peptide in Stick-Darstellung. C: Position der Ribose in der PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-Fasudil-Struktur. D: Position der Ribose in der PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-BFS-Struktur. E: Überlagerung der Stick-Darstellung der Ribosen in beiden Strukturen. Fasudil und BFS sind in allen Darstellungen in der Stick-Darstellung gezeigt. Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt.

Bei Vergleich der Strukturen zeigte sich, dass bei Einführung der Phenylboronsäure in Fasudil eine Verschiebung des Glycin-reichen *Loops* stattfindet. In der Struktur mit BFS wird der Glycin-reiche *Loop* geringfügig weg von der *hinge*-Region geschoben. Dies ist überraschend, da in den meisten Strukturen in Folge der Derivatisierung von Fasudil keine Veränderung des Glycin-reichen *Loops* stattfindet.

Ebenfalls wird das Peptid, das bei Einführung von Fasudil weg von der *hinge*-Region verschoben wurde, wieder zurück in Richtung auf die *hinge*-Region bewegt, wenn die Phenylboronsäure an Fasudil angefügt wurde.

Dieser Effekt ist besonders stark am Ende der α -Helix im Peptid, in direkter Nachbarschaft des Ribothreonins. Dabei wird auch die Orientierung der Ribose deutlich verändert. Ebenfalls tritt der bereits mehrfach beobachtete Wechsel des Arg¹⁸-Rotamers auf. Eine genauere Betrachtung der *hinge*-Binder ist in Abbildung 68 gezeigt.

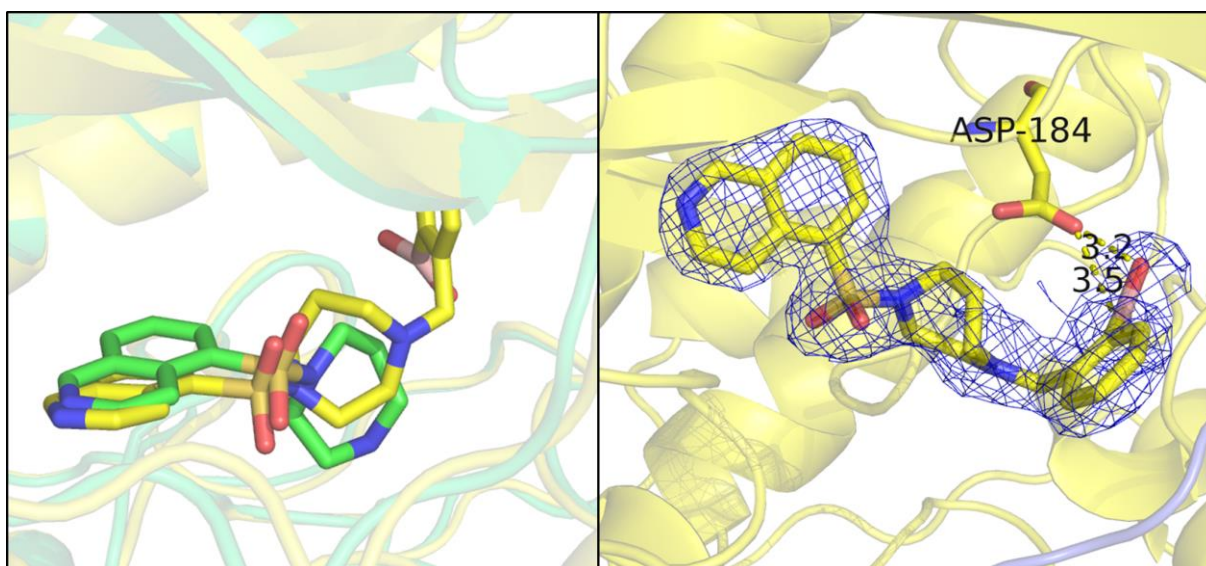


Abbildung 68: Links gezeigt ist die Orientierung von BFS in der *hinge*-Region der PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-BFS-Komplex-Struktur (PKA in Cartoon-Darstellung gelb, BFS in Stick-Darstellung, PDB-Code: 6EMC) überlagert mit der Orientierung von Fasudil in der *hinge*-Region der PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-Fasudil-Komplex-Struktur (PKA in Cartoon-Darstellung grün, Fasudil in Stick-Darstellung, PDB-Code: 6EMB). Rechts gezeigt ist die Umgebung von BFS in der *hinge*-Region der PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-BFS-Komplex-Struktur. Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt.

Es wurde offensichtlich, dass in der Orientierung des *hinge*-Binders eine Änderung auftritt. Der Isochinolin-Ring in BFS wird von der *hinge*-Region geringfügig weggeschoben und dabei verkippt. Der 1,4-Homopiperazin-Ring wird stärker ausgelenkt, als dies in den meisten Strukturen mit BFS zu registrieren ist. Trotz des veränderten Bindungsmodus geht die Boronsäure Wasserstoffbrückenbindungen mit Asp¹⁸⁴ ein, diese sind jedoch im Vergleich mit den anderen Strukturen aufgeweitet und mit keinem optimalen Winkel ausgerichtet. Der Bindungsmodus wurde somit im Vergleich zu anderen Strukturen mit BFS deutlich verändert.

Der größte Unterschied, der beobachtet werden konnte, ist jedoch, dass ein zweites BFS-Molekül im Bereich der langen α -Helix am Beginn der PKA-Sequenz (Aminosäuren 1-30) gebunden wird. Dies ist in Abbildung 69 gezeigt.

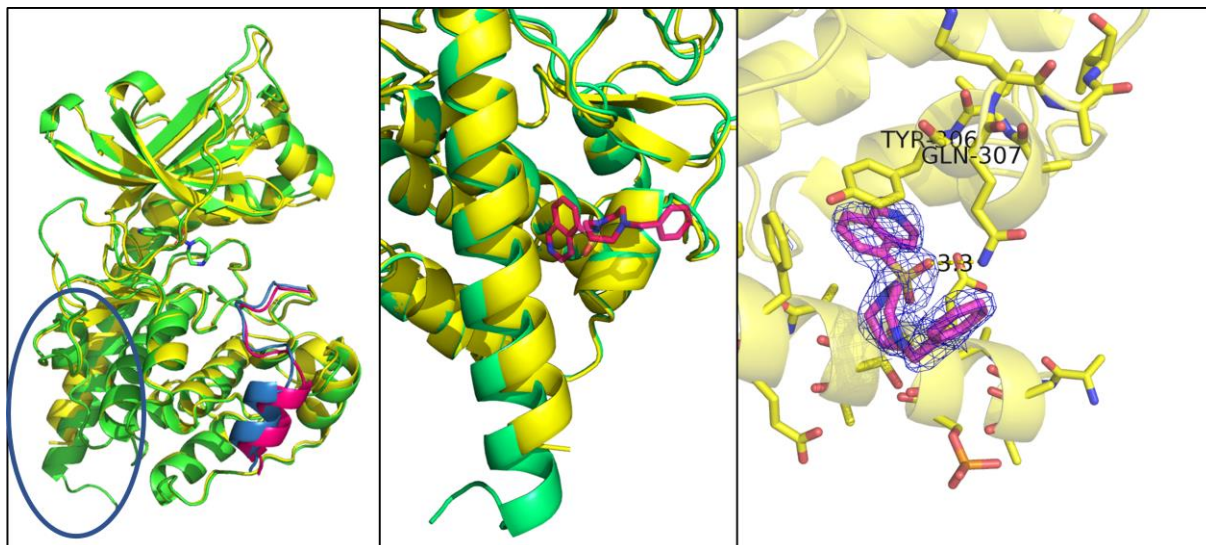


Abbildung 69: Links gezeigt ist die Überlagerung der PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-BFS-Komplex-Struktur (PKA in Cartoon-Darstellung gelb, BFS in Stick-Darstellung lila, PDB-Code: 6EMC) mit der PKA in der PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-Fasudil-Komplex-Struktur (PKA in Cartoon-Darstellung grün, PDB-Code: 6EMB). Hervorgehoben in Blau ist die Position der α -Helix. Mittig ist die Orientierung von BFS in der Helix-Region gezeigt. Rechts ist die genauere Umgebung des BFS in der Helix-Region der PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-BFS-Komplex-Struktur. Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt.

Bedingt durch die Bindung des zweiten BFS-Moleküls wird die α -Helix¹⁻³⁰ der PKA deutlich in Richtung des Protein-Inneren ausgelenkt. Ebenfalls wird eine sehr schwache Wasserstoffbrückenbindung zwischen Gln³⁰⁷ des Proteins und einem der Sulfonamid-Sauerstoffe in BFS ausgebildet. Die Ausbildung von Interaktionen über verbrückende Wassermoleküle kann aufgrund der geringen Auflösung der PKA-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-BFS-Komplex-Struktur von 1,97 Å jedoch nicht eindeutig beurteilt werden. Erwähnenswert ist hierbei das Tyr³⁰⁶ oberhalb des Isochinolin-Rings von BFS zum Liegen kommt. Ein π -Stacking, also die Interaktion zweier übereinanderliegender aromatischer Systeme, deutet eine Interaktion zwischen der PKA und BFS an. Tyr³⁰⁶ befindet sich oberhalb des Isochinolin-Ringes in einer geeigneten Distanz für ein π -Stacking. Bei der Kombination aus PKA, PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²² und Fasudil-Derivaten tritt somit ein starker ligandeninduzierter Effekt ein.

Nicht nur die Orientierung des Peptides wird durch die Einführung des Fasudil-Derivates bestimmt, auch die Orientierung des Glycin-reichen *Loops* wird verändert. Durch das an Position 16 mit Ribothreonin variierte Peptid kommt es zu einer Änderung des Bindungsverhaltens von BFS; die Interaktion des Boronsäure findet nur schwach mit Asp¹⁸⁴ statt und eine zweite Bindetasche im Bereich der anfänglichen α -Helix der PKA wird adressiert.

6.5.5 Ligandeninduzierte Effekte auf PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² durch Einführung von Fasudil-Derivaten

Für die Boronsäure-Aminosäure BAR war nicht vorgesehen, dass mit Fasudil-Derivaten eine Verknüpfung ausgebildet wird. Jedoch war es dennoch interessant zu testen, welche Effekte die Einführung einer solchen Variation auf die Interaktion von Peptiden und Fasudil-Derivaten mit der PKA ausübt. Auch wenn für den Komplex PKA-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² eine Struktur erhalten werden konnte, blieb die Kristallisation für die Komplexe mit Fasudil-Derivaten größtenteils erfolglos. Nach mehreren Versuchen konnte schließlich eine Struktur des PKA-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²²-BFS-Komplexes erhalten werden. In Abbildung 70 ist ein Vergleich der Strukturen mit und ohne BFS gezeigt.

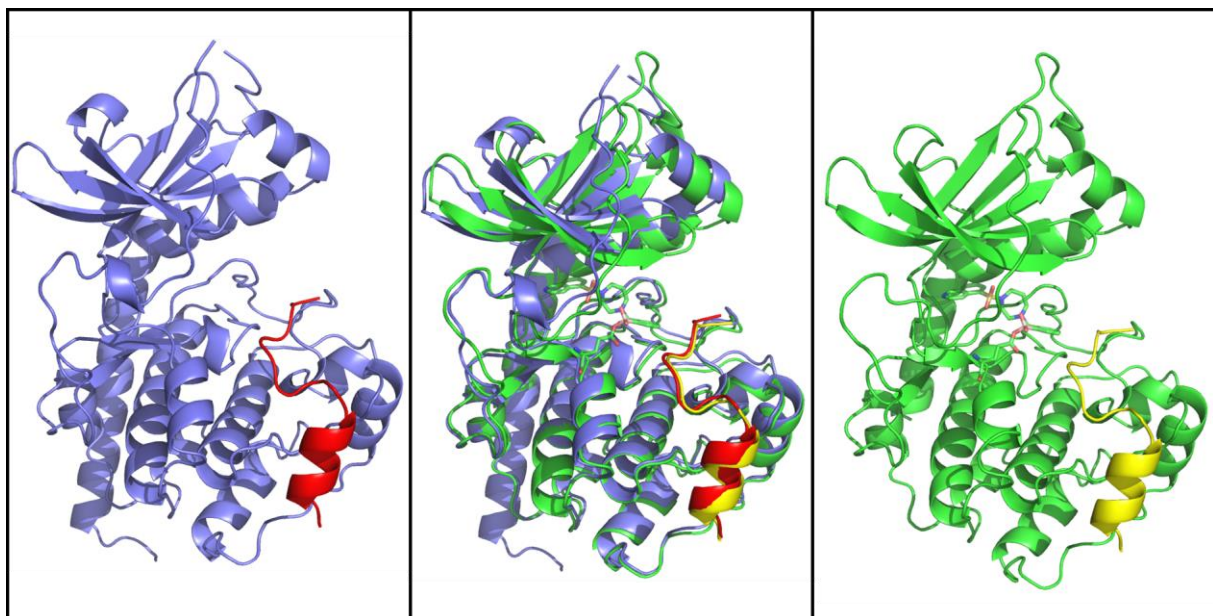


Abbildung 70: Vergleich der Komplexstrukturen in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² (links, PKA blau, Peptid rot, PDB-Code: 5OUS) und PKA-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²²-BFS (rechts, PKA grün, Peptid gelb, PDB-Code: 6ERT). In der Mitte ist die Überlagerung beider Kristallstrukturen gezeigt. BFS ist in allen Darstellungen in der Stick-Darstellung gezeigt, wobei die Kohlenstoffe grün gefärbt sind.

Im Gegensatz zu den meisten anderen variierten Peptiden, führte die Zugabe von BFS nicht zu einer Verschiebung des Peptides weg von der *hinge*-Region, sondern die Orientierung des Peptides blieb größtenteils unverändert. Die Verschiebung des Glycin-reichen *Loops* in Richtung des Peptides, die bei Einführung der Fasudil-Derivate oftmals beobachtet wurde, deutet sich in diesem Fall zwar an, da der *Loop* in der PKA-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²²-Komplexstruktur jedoch teilweise fehlgeordnet vorlag, konnte der Vergleich jedoch nicht zweifelsfrei geführt werden. Zwei besonders signifikante Änderungen in der Struktur sind in Abbildung 71 gezeigt.

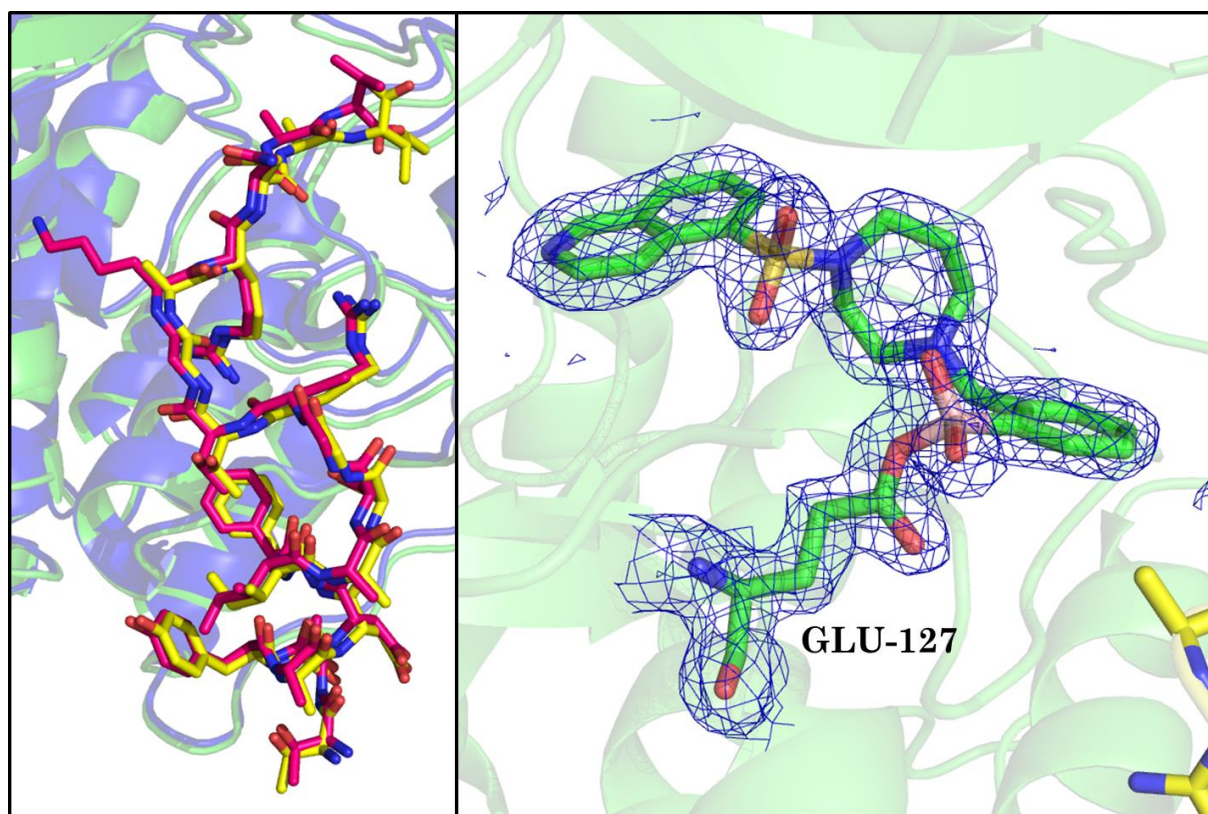


Abbildung 71: Links gezeigt ist der Vergleich der Komplexstrukturen in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² (PKA in Cartoon-Darstellung blau, Peptid in Stick-Darstellung hellrot, PDB-Code: 5OUS) und PKA-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²²-BFS (PKA in Cartoon-Darstellung grün, Peptid in Stick-Darstellung gelb, PDB-Code: 6ERT). Rechts gezeigt ist die Orientierung von BFS in der PKA-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²²-BFS-Struktur. BFS ist in allen Darstellungen in der Stick-Darstellung gezeigt. BFS ist kovalent an Glu¹²⁷ gebunden. Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt.

Bei Betrachtung des Peptides wurde deutlich, dass die in der PKA-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²²-Komplexstruktur zum größten Teil fehlgeordnet vorliegende Seitenkette von BAR¹⁸ in der PKA-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²²-BFS-Komplexstruktur vollständig fehlgeordnet auftritt.

Es scheint so, als wäre die BAR-Seitenkette an Position 18 unvorteilhaft für eine Interaktion mit der Kinase und verbleibt deshalb konformativ flexibel. Die stärker ausgeprägte Änderung bei der Einführung von BFS ist jedoch, dass die Boronsäure sich bei der Kristallbildung kovalent mit der Säuregruppe von Glu¹²⁷ der PKA verknüpft. Dies wurde in der Dichte sowohl durch die kurze Distanz des Bors zum Glutamat-Sauerstoff, als auch durch den Übergang der planaren Geometrie am Bor der Boronsäure in eine tetraedrische Konfiguration deutlich. Eine solche Verknüpfung konnte in keiner anderen Kristallstruktur nachgewiesen werden, zeigt aber das potente reaktive Verhalten der Boronsäure für den Angriff durch ein benachbartes Nukleophil.

Die Verknüpfung der Boronsäure mit einer Sauerstoffgruppierung, hier im Fall des benachbarten Glutamats, ist nicht verwunderlich; das Konzept zum Design der *Self-Assembly*-Komplexe sieht eine vergleichbare Veresterung der Boronsäure mit den beiden Hydroxygruppen der Ribose vor. Die dabei auftretende Abspaltung von Wasser könnte einen entropischen Vorteil zur Erhöhung der Bindungsaffinität liefern. Im Falle der Ribose wäre eine dritte Hydroxygruppe zumindest in der Nähe vorhanden, die eine Koordinationserweiterung an Bor eingehen könnte und so zu einem tetraedrischen Komplex führen könnte. Diese Koordinationserweiterung konnte von Dr. ROMINA KIRSCHNER vom AG GEYER im NMR jedoch selbst bei Verknüpfung der Komponenten in DMSO nicht beobachtet werden.^[34] Im Falle des Glutamats tritt keine Abspaltung von Wasser auf. Da bei einem pH-Wert von 6,9 kristallisiert wurde, sollte das Glutamat ($pK_{S\gamma-COOH} = 4,32$)^[38] deprotoniert vorliegen. Die negativ geladene Sauerstoffgruppe greift somit nukleophil das Bor an, erweitert dessen Koordination und sorgt formell für eine negative Ladung auf dem Bor. Verwunderlich ist, dass eine solche Verknüpfung nur in dieser einen Kristallstruktur auftrat. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Mutation des Peptides an Position 18. An Position 18 liegt im nativen PKI⁵⁻²² das für die Affinität essentielle Arginin 18 vor, das mit der ATP-Bindetasche Interaktionen eingeht. In den allermeisten Strukturen liegt dieses Arginin räumlich nahe an Glu¹²⁷ und erlaubt keinen Kontakt zwischen BFS und dem Glutamat; die dominierenden Interaktionen von Arg¹⁸ mit dem Glu¹²⁷-Rest erlauben keine konformative Umlagerung der Glu-Seitenkette aus der Bindetasche.

In den Komplexen von PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-BFS und PKA-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²²-BFS wurde Arg¹⁸ gegen eine strukturell wesentlich größere Aminosäure variiert; beide Peptid-Varianten zeigen stark reduzierte Affinität in den Bindungsassays. Weiterhin sind beide Aminosäuren in den Kristallstrukturen in hohem Maße fehlgeordnet und bilden sicher keine starken Interaktionen in der Bindetasche zu Glu¹²⁷ aus.

Auch wenn im PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-BFS-Komplex die Position der Phenylboronsäure nur modelliert und nicht experimentell in der Elektronendichte bestimmt werden konnte, so scheint auch in diesem Komplex BFS nicht in Richtung des Glycin-reichen *Loops*, sondern in Richtung auf das im PKI eingeführte RBS¹⁸ ausgerichtet zu sein. Es scheint somit so, als würde der Austausch von Arg¹⁸ gegen eine leicht aus der Bindetasche verdrängbare Aminosäure, wie RBS und BAR, Platz für eine Orientierung des Phenylboronsäurerestes an Konformation am BFS freigeben. Diese nimmt jetzt die Position des am natürlichen Substrat befindlichen Arg¹⁸ ein und verdrängt das dort eingeführte Riboserin oder BAR, die beide ausgeprägte Flexibilität aufweisen. Dadurch kann BFS jetzt eine Reaktion mit Glu¹²⁷ eingehen. Somit scheint das Konzept des *Self-Assembly*-Komplexes grundsätzlich mit Boronsäuren möglich zu sein, allerdings müssen die Geometrie, die Abstände und Winkel beider Reaktionspartner im proteingebundenen Zustand zueinander perfekt vororientiert sein, damit eine Verknüpfung auch wirklich stattfinden kann.

6.6 Ligandeninduzierte Effekte auf Fasudil-Derivate durch variierte Peptide

6.6.1 Allgemein

Wie sich zeigte, können Fasudil-Derivate einen ligandeninduzierten Effekt auf die Orientierung der gebundenen Peptide ausüben. Jedoch scheint auch umgekehrt ein Effekt der Peptide auf die Orientierung der Fasudil-Derivate vorzuliegen. Dies zeigte sich beispielsweise in den Komplexstrukturen von PKA-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²²-BFS oder auch PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-BFS. Somit ist es ebenfalls interessant zu bestimmen, welche Effekte die Variation der Peptide auf die Orientierung der Fasudil-Derivate aufweist.

6.6.2 Ligandeninduzierte Effekte auf Fasudil durch Peptide

In Abbildung 72 ist ein Vergleich aller in den Kristallstrukturen beobachteter Bindungsmodi von Fasudil gezeigt.

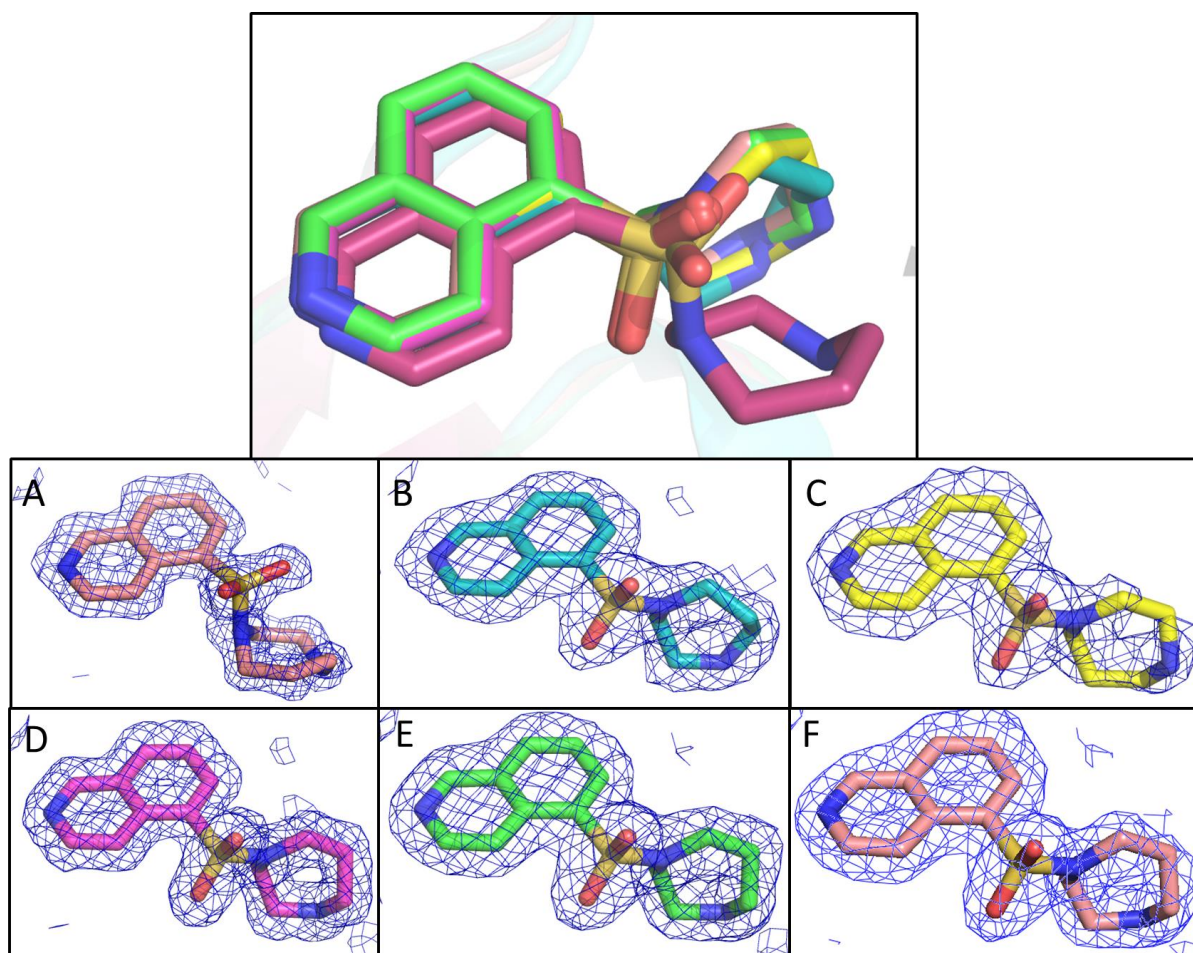


Abbildung 72: Oben gezeigt ist die Überlagerung aller in den Kristallstrukturen gefundenen Bindungsmodi von Fasudil in Stick-Darstellung. Darunter sind die Einzel-Bindungsmodi inklusive ihrer $2mF_o - F_c$ -Elektronendichte bei 1σ gezeigt. A: PKA-Fasudil-Komplex (Kohlenstoffe hellrot, PDB-Code: 6EM2), B: PKA-Fasudil-PKI⁵⁻²²-Komplex (Kohlenstoffe cyan, PDB-Code: 6ERW), C: PKA-Fasudil-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-Komplex (Kohlenstoffe gelb, PDB-Code: 5NW8), D: PKA-Fasudil-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-Komplex (Kohlenstoffe lila, PDB-Code: 5O0E), E: PKA-Fasudil-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²²-Komplex (Kohlenstoffe grün, PDB-Code: 6EMB), F: PKA-Fasudil-PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²²-Komplex (Kohlenstoffe rosa, PDB-Code: 6ERS).

Wie sich zeigte hat die Variation des Peptides praktisch keinen Effekt auf die Orientierung von Fasudil. Lediglich die völlige Abwesenheit eines peptidischen Liganden sorgt für die Veränderung des Bindungsmodus von Fasudil. Somit tritt kein ligandeninduzierter Effekt der variierten Peptide auf Fasudil auf, vermutlich ist Fasudil zu weit entfernt von den Aminosäuren des Peptides, um durch sie beeinflusst zu werden. Vermutlich ist der Ligand auch zu wenig flexibel, um leicht veränderte Bindungsmodi einzunehmen. Erst die große Änderung des fehlenden Peptides sorgt für einen deutlich veränderten Bindungsmodus.

6.6.3 Ligandeninduzierte Effekte auf BFS durch Peptide

In Abbildung 73 ist ein Vergleich aller in den Kristallstrukturen beobachteter Bindungsmodi von BFS an die *hinge*-Region gezeigt.

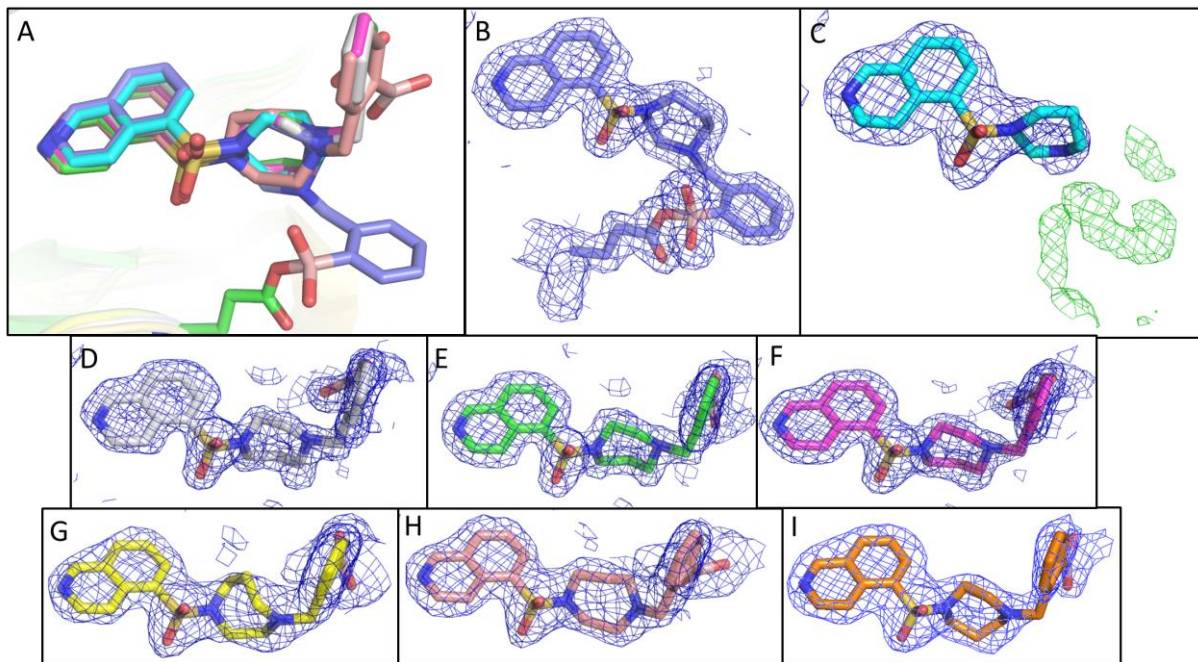


Abbildung 73: A: Überlagerung aller in den Kristallstrukturen gefundenen Bindungsmodi von BFS an die *hinge*-Region in Stick-Darstellung. B kovalent an Glu¹²⁷ gebundene BFS-Bindungsmodus im PKA-BFS-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²²-Komplex (Kohlenstoffe hellblau, PDB-Code:6ERT). C: Bindungsmodus in PKA-BFS-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² (Kohlenstoffe cyan, nicht in der RSCPDB hinterlegt) inklusive der mF_o-F_c-Elektronendichte bei 3 σ , die den fehlgeordneten Bereich des BFS andeutet. Darunter sind die Einzel-Bindungsmodi inklusive ihrer 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ gezeigt. D: PKA-BFS-PKI⁵⁻²² (Kohlenstoffe weiß, PDB-Code:5OL3) E: PKA-BFS-PKI(RBS¹³)⁵⁻²² (Kohlenstoffe grün, PDB-Code:6EGW), F: PKA-BFS-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² (Kohlenstoffe lila, PDB-Code:5O5M). G: PKA-BFS-PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²² (Kohlenstoffe gelb, PDB-Code:6EMC), H: PKA-BFS-PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²² (Kohlenstoffe rosa, PDB-Code:6EMD), I: PKA-BFS-PKI(RBS²¹)⁵⁻²² (Kohlenstoffe orange, PDB-Code:5OT3). Die 2mF_o-F_c-Elektronendichten sind als blaues, mF_o-F_c-Elektronendichte als grünes Netz gezeigt.

Es zeigte sich, dass ein geringer ligandeninduzierter Effekt der variierten Peptide auf BFS stattfindet. Die meisten variierten Peptide üben keinen großen Effekt auf den Bindungsmodus von BFS aus, bis auf wenige Ausnahmen zeigen alle Orientierungen der Phenylboronssäure-Seitenkette des BFS in Richtung des Glycin-reichen *Loops* und gehen eine Interaktion mit Asp¹⁸⁴ ein. Je nach variiertem Peptid ist diese Interaktion aufgrund der sich abzeichnenden Wechselwirkungsgeometrie als stärker oder schwächer anzunehmen, tritt jedoch immer auf. Der größte auftretende strukturelle Effekt tritt bei der Kombination mit den Peptiden PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² und PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² auf.

Bei diesen Peptiden wird BFS neu ausgerichtet und zeigt in Richtung der Peptid-Position 18. Dies ist in Abbildung 74 gezeigt.

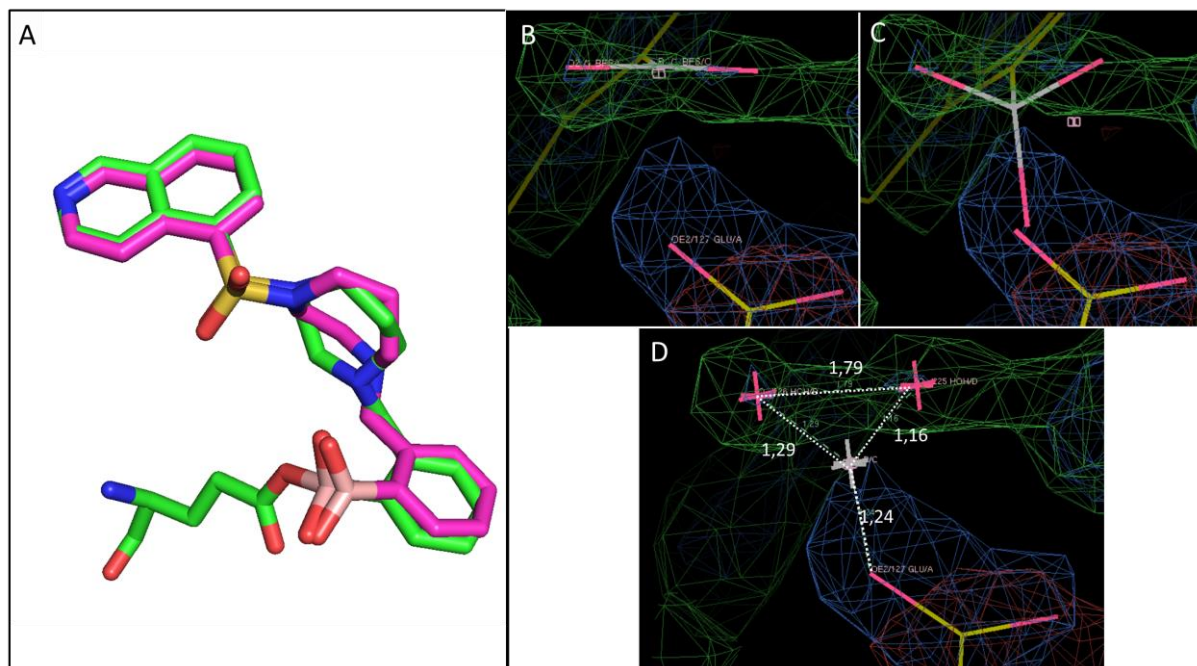


Abbildung 74: A: Überlagerung des Bindungsmodus des kovalent an Glu¹²⁷ gebundenen BFS in der PKA-BFS-PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²²-Komplex-Struktur (grün, PDB-Code:6ERT) mit dem modellierten Bindungsmodus von BFS in der PKA-BFS-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-Komplex-Struktur (lila, nicht in der RSCPD B deponiert). B: In Coot durchgeführte Modellierung der Boronsäure in der PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-BFS-Komplexstruktur. C: In Coot durchgeführte Modellierung einer tetraedrischen Koordination an der Boronsäure. D: Modellierung der Sauerstoffatome in die stärkste Elektronendichte inklusive Bindungslängenabstände. In grün ist die mF_o-F_c-Elektronendichte bei 3 σ gezeigt, während die 2 mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ in blau konturiert ist.

In Kombination mit PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² ist es in der Lage, die Aminosäure an Position 18 zu verdrängen und mit Glu¹²⁷ unter Ausbildung einer kovalenten Verknüpfung zu reagieren. In der modellierten Struktur von BFS in Kombination mit PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² zeigt die Boronsäure eine analoge Ausrichtung. Jedoch konnte hierbei die Verknüpfung mit Glu¹²⁷ in der Kristallstruktur aufgrund einer nur unzureichenden Qualität der Differenzdichte nicht eindeutig zugewiesen werden. Die Elektronendichte in der Struktur mit PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² scheint eher eine planare Konfiguration des Bors als eine tetraedrische Konfiguration anzudeuten. Würde dagegen eine tetraedrische Konfiguration des Bors angenommen, ließe sich eine kovalent verknüpfte Form analog zum Komplex mit PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² modellieren.

Die Sauerstoff-Atome würden bei einer solchen Modellierung jedoch nicht in die stärksten Elektronendichtemaxima gelegt, da hierbei die Bindungslängen zwischen Bor und Sauerstoff deutlich zu kurz würden. Dies ist in Abbildung 74 gezeigt.

Möglicherweise liegen kovalent verknüpfte wie auch unverknüpfte Form nebeneinander vor, wobei sich ein sterischer Konflikt zwischen Glu¹²⁷, der Ribose von RBS¹⁸ und der Boronsäuregruppe von BFS nicht ausschließen lässt. Die kovalent verknüpfte Form von BFS mit Glu¹²⁷, die zwischen der Ribose und Glu¹²⁷ ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindung und die durch das alternative Konformer zwischen der Boronsäuregruppe und Asp¹⁸⁴ ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen liegen vermutlich jeweils partiell populierte nebeneinander vor. Die Elektronendichte wird somit sehr diffus und erlaubt keine eindeutige Zuweisung, da sich in einem solchen Fall im Diffraktionsbild nur eine gemittelte Struktur abzeichnet. Hierbei stellt sich allerdings die Frage, ob der beobachtete Effekt wirklich durch die Art der Variation im Peptid (vergleiche beispielsweise R18BAR) ermöglicht wird oder nur deshalb auftritt, weil durch das „Wegmutieren“ von Arg¹⁸ genügend Platz für Interaktionen mit Glu¹²⁷ geschaffen wird. Zur Differenzierung dieses Effekts wäre es denkbar eine R18A-Variante des Peptides zu synthetisieren und zu kristallisieren. Die Affinität dieser Variante wäre zwar mit hoher Wahrscheinlichkeit gering, da sämtliche vorteilhaften Interaktionen von Arg¹⁸ verloren gingen, jedoch wäre die Umgebung von Glu¹²⁷ zugänglich für BFS. Würde diese Verknüpfung wieder ausgebildet, so könnte ein ligandeninduzierter Effekt der Peptidvariation ausgeschlossen werden und der Ligand BFS als alleinig für die Verknüpfung verantwortlich beurteilt werden. Ebenfalls wäre es denkbar die PKA ohne peptidischen Liganden, aber mit BFS zu kristallisieren. Hierbei muss jedoch die Veränderung der PKA-Struktur durch das fehlende Peptid als möglicher Einfluss auf die Ausrichtung der Bindetasche in Betracht gezogen werden.

6.6.4 Ligandeninduzierte Effekte auf BFF durch Peptide

In Abbildung 75 ist ein Vergleich aller in den Kristallstrukturen beobachteter Bindungsmodi von BFF gezeigt.

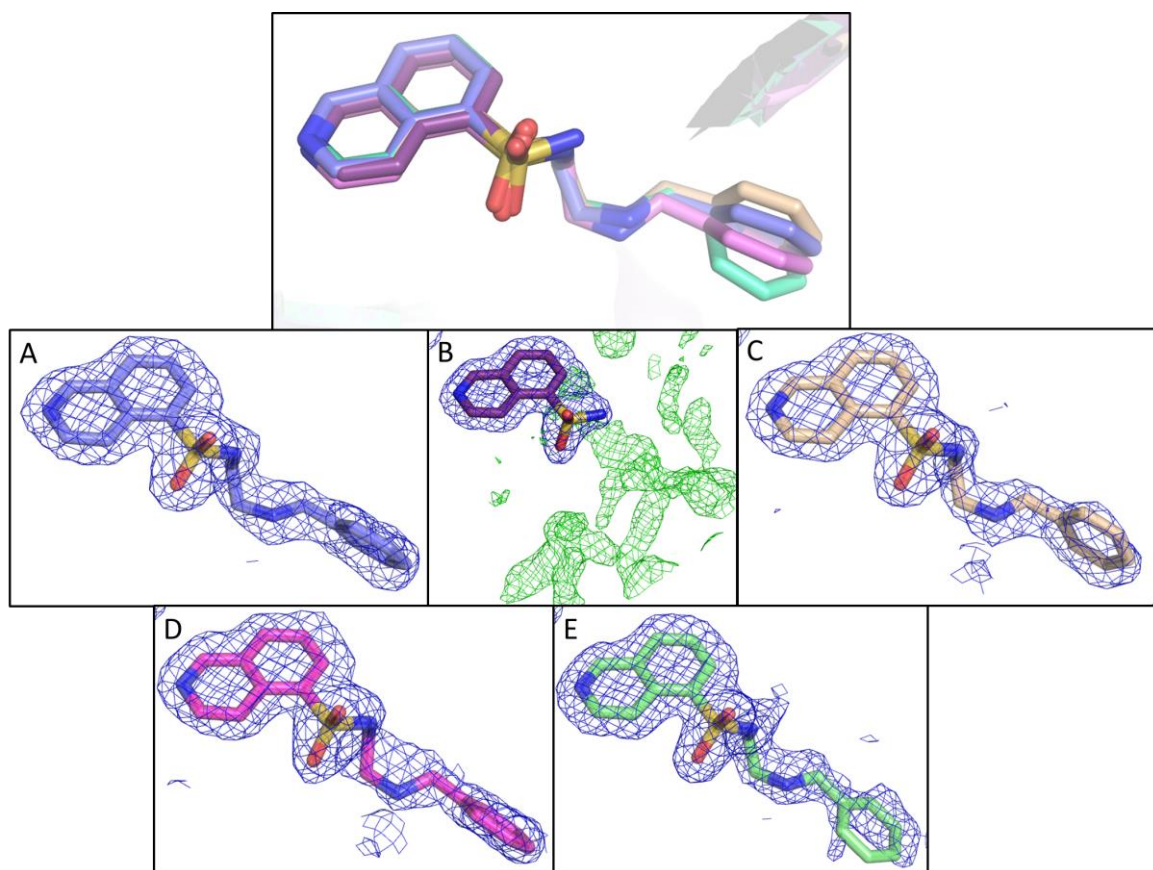


Abbildung 75: Oben ist die Überlagerung aller in den Kristallstrukturen gefundenen Bindungsmodi von BFF in Stick-Darstellung gezeigt. Darunter sind die Einzel-Bindungsmodi inklusive ihrer $2mF_o-F_c$ -Elektronendichte bei 1σ gezeigt. A: PKA-BFF-PKI⁵⁻²² (Kohlenstoffe blau, PDB-Code:5OTG), B: PKA-BFF-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² (Kohlenstoffe lila, nicht in der RSCPDDB hinterlegt), C PKA-BFF-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² (Kohlenstoffe beige, PDB-Code:6EH3). D: PKA-BFF-PKI(RBS¹⁷⁰)⁵⁻²² (Kohlenstoffe lila, PDB-Code:6EME), E: PKA-BFF-PKI(RBS²¹)⁵⁻²² (Kohlenstoffe grün, PDB-Code:5OUC). Die $2mF_o-F_c$ -Elektronendichte ist als blaues, die mF_o-F_c -Elektronendichte bei 3σ als grünes Netz gezeigt.

Die Betrachtung der Bindungsmodi zeigte nur sehr geringe ligandeninduzierte Effekte der variierten Peptide auf BFF. Die einzige auftretende Veränderung im Bindungsmodus war eine schwache Verkipfung des terminalen Phenylrings. Diese ist jedoch nur schwach ausgeprägt. BFF scheint somit größtenteils unabhängig von der Art der Variation im Peptid zu sein.

6.7 Fazit zur Verknüpfung von Boronsäure-Fasudilen mit Ribo-Aminosäuren

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mehrere zur Verknüpfung von Peptid- und ATP-Bindetasche geeignet erscheinende Variationen des literaturbekannten PKI⁵⁻²² identifiziert werden. Diese Variationen wurden in Komplex mit verschiedenen Boronsäure-Fasudilen kristallisiert. Es zeigte sich, dass in keinem der untersuchten Beispiele eine Verknüpfung der Ribosen mit den Boronsäuren auftraten.

Selbst bei der in Kontakt tretenden Kombination aus PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² und BFS, die in einer modellierten Struktur eine Wasserstoffbrücke ausbilden könnte, trat keinerlei feste kovalente Verknüpfung auf. Stattdessen wurde in der Kombination aus PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² und BFS eine unter Konfigurationserweiterung ablaufende Verknüpfung der terminalen Boronsäure im BFS mit Glu¹²⁷ beobachtet. Dies zeigte, dass die in DMSO stattfindende Verknüpfung einer Boronsäure mit Sauerstoffgruppen als *Self-Assembly*-Reaktion auch in einer Proteinumgebung möglich ist.^[34] Jedoch scheint die erhoffte Verknüpfung der Boronsäuren mit den benachbarten Ribosen vermutlich aufgrund einer nicht optimalen Geometrie der beiden Interaktionspartner im proteingebundenen Zustand zu unvorteilhaft zu sein. Dadurch könnte die Proteinumgebung (Hydrathülle, benachbarte Aminosäuren etc.) aus sterischen Gründen oder hinsichtlich der Energiebilanz im Vergleich zur Ausbildung dieser Verknüpfung in DMSO-Lösung so wenig begünstigt zu sein, dass sie in der Proteinumgebung nicht nachzuweisen ist. Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass das gewünschte Konzept der Verknüpfung zweier Bindetaschen durch *Self-Assembly*-Komplexbildung unter Verwendung einer Ribose als einem und einer Boronsäure als anderem Bindungspartner im Umfeld der PKA nicht verwirklicht werden konnte.

6.8 Versuche zur Verknüpfung von Adenosinphosphaten mit Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren

6.8.1 Allgemein

Neben der Einführung eines inhibitorischen *hinge*-Binders vom Typ des Fasudils bot die Interaktion mit dem natürlichen Substrat ATP oder dessen Spaltprodukte ADP und AMP einen weiteren interessanten Einstiegspunkt zum Aufbau von *Self-Assembly*-Komplexen.

Hierzu wurden zwei grundsätzliche Strategien verfolgt: Zum einen die Interaktion des β - oder γ -Phosphates der Adenosinphosphate mit den Ribosen der Ribo-Aminosäuren in PKI-Analoga und zum anderen die Verknüpfung des Ribosezuckers in den Adenosinphosphaten mit der Boronsäure in Boronsäure-Aminosäuren der PKI-Derivate. Für diese Vorgehensweise wurden drei Varianten des PKI⁵⁻²² ausgewählt.

Sowohl PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² als auch PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² enthielten Riboserine an Positionen, an denen im nativen PKI⁵⁻²² Aminosäuren vorlagen, die mit ATP Interaktionen eingehen.

Das Riboserin in PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² war hierbei zwar grundsätzlich in Richtung von ATP orientiert, würde allerdings aus räumlichen Gründen eher mit dem Zucker von ATP als mit den Phosphaten interagieren. Dennoch wurde die Kombination dieser PKI⁵⁻²²-Variante mit AMP, ADP und ATP kristallisiert, um zu prüfen, ob durch ligandeninduzierte Effekte eine veränderte Orientierung der Phosphate auftritt, die dennoch eine Verknüpfung ermöglichen würde. PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² wies dagegen ein Riboserin auf, dass direkt in Richtung des γ -Phosphates zeigen sollte. In den Kristallstrukturen mit *hinge*-bindenden Fasudilderivaten war die Ribose an Position 20 in hohem Maß fehlgeordnet, sodass die genaue Orientierung nicht im Voraus beurteilt werden konnte. Aus der Orientierung des der Dichte zuweisbaren Serin-Teils des Riboserins konnte die ungefähre Orientierung der Ribose jedoch abgeschätzt werden. Die dritte verwendete PKI⁵⁻²²-Variante war PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²², die eine Boronsäure-Aminosäure enthielt. Diese Boronsäure sollte eine Verknüpfung mit dem Zucker der Adenosinphosphate eingehen.

6.8.2 Versuche zur Interaktion von Adenosinphosphaten mit PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²

Bei den Kristallisationsversuchen mit PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² und den Adenosinphosphaten konnten bereits ohne Verwendung des LC55/10-Puffers Kristalle erhalten werden, diese wiesen jedoch deutlich reduzierte Qualität auf. Somit wurde auch hier der LC55/10-Puffer eingesetzt, jedoch wurde nur mit einer Konzentration der Adenosinphosphate von 2 mmol · L⁻¹ gearbeitet. Eine höhere Konzentration war jedoch auch nicht vonnöten. Bereits bei der niedrigen Konzentration der Adenosinphosphate konnten vollständig definierte Elektronendichten in den Strukturen erhalten werden. Interessanterweise wiesen die Strukturen die aus Kristallen, die mit ATP angesetzt worden waren, nur Elektronendichte für ADP auf.

Eine fehlende Ordnung des γ -Phosphates wäre eine mögliche Erklärung gewesen, anhand der ansonsten vollständig geordneten Elektronendichte inklusive der koordinierten Magnesium-Ionen und der nicht auftretenden Änderung wurde jedoch davon ausgegangen, dass ATP während der Kristallisation in der Lösung hydrolysiert und somit zu ADP gespalten worden war. Die unter diesen Bedingungen erhaltenen Strukturen werden somit in dieser Diskussion vernachlässigt, da sie identisch mit den Strukturen sind, die unter Zugabe von ADP erhalten wurden. In Abbildung 76 ist ein Vergleich der erhaltenen Kristallstrukturen gezeigt.

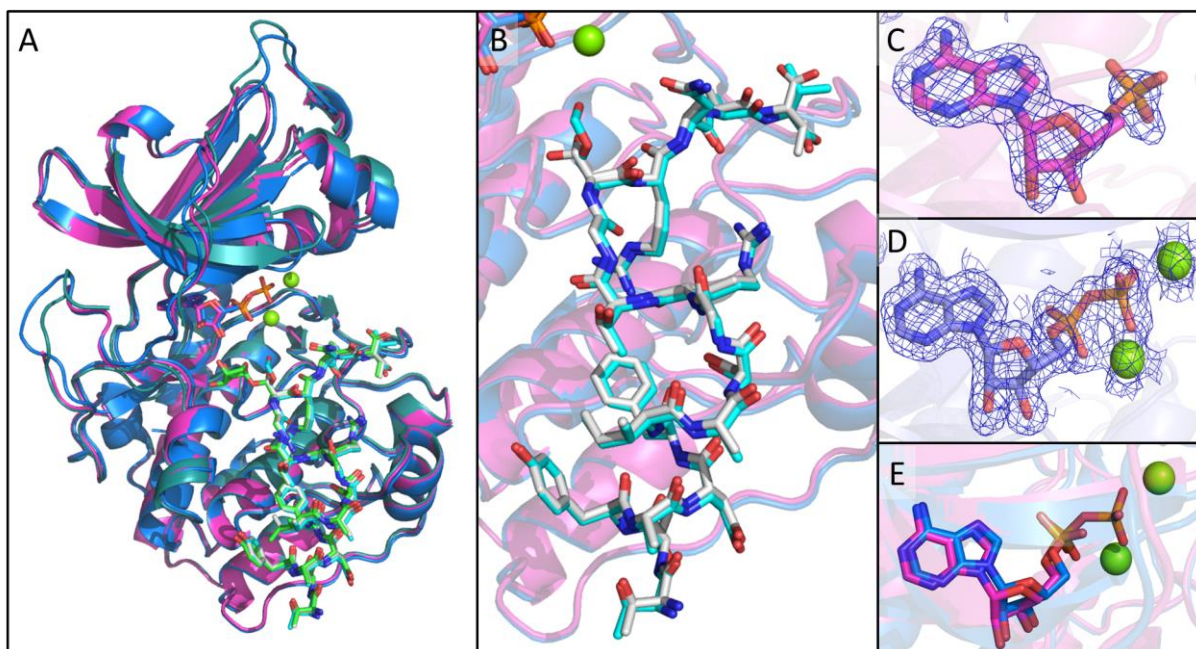


Abbildung 76: A: Überlagerung der Komplexstrukturen in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² (PKA in Cartoon-Darstellung dunkelgrün, Peptid in Stick-Darstellung hellgrün, PDB-Code: 5NTJ), PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-

AMP (PKA in Cartoon-Darstellung lila, Peptid in Stick-Darstellung grau, PDB-Code: 6EH2) und PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-ADP (PKA in Cartoon-Darstellung blau, Peptid in Stick-Darstellung blau, PDB-Code: 6EM6).

B: Überlagerung der Kristallstrukturen von PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-AMP und PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-ADP mit Ausschnittsvergrößerung auf die Peptide in Stick-Darstellung. C: Bindungsmodus von AMP in der PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-AMP-Komplexstruktur. D: Bindungsmodus von ADP in der PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-ADP-Komplexstruktur. E: Bindungsmodus von AMP und ADP der beiden Strukturen überlagert. Magnesium-Ionen sind als gelbgrüne Kugeln gezeigt. Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt.

Es zeigte sich, dass bei der Bindung der Adenosinphosphate der Glycin-reiche *Loop* in Richtung auf die ATP-Bindetasche herabgezogen wird. Die Orientierung des Peptides bleibt jedoch, bis auf das aufgrund dessen Flexibilität mehrfach mit veränderter Rotamerorientierung nachgewiesene Ile²² identisch. Weiterhin wurde offensichtlich, dass keinerlei Verknüpfung zwischen den Ribosen und den Adenosinphosphaten ausgebildet wird. Die Phosphate sind nicht in Richtung der Ribosen ausgerichtet und die Ribosen liegen größtenteils fehlgeordnet vor.

6.8.3 Versuche zur Interaktion von Adenosinphosphaten mit PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²

Die Kristallisation der PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-Komplexe mit den Adenosinphosphaten erwies sich als schwierig. Unter den Standard-Bedingungen mit LC-Puffer konnten keinerlei Kristalle erhalten werden.

Unter den veränderten Bedingungen mit LC55/10-Puffer konnten Kristalle erhalten werden, bei einer Konzentration der Adenosinphosphate von $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ lag jedoch nur sehr schwache Elektronendichte der Adenosinphosphate vor, weshalb die Konzentration auf $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ erhöht wurde. Hierfür konnten zwar Strukturen mit AMP und ADP erhalten werden, ATP sorgte bei diesen Konzentrationen jedoch für die Denaturierung des Proteins und somit zu keiner Kristallbildung. Ein Vergleich der Strukturen ist in Abbildung 77 gezeigt.

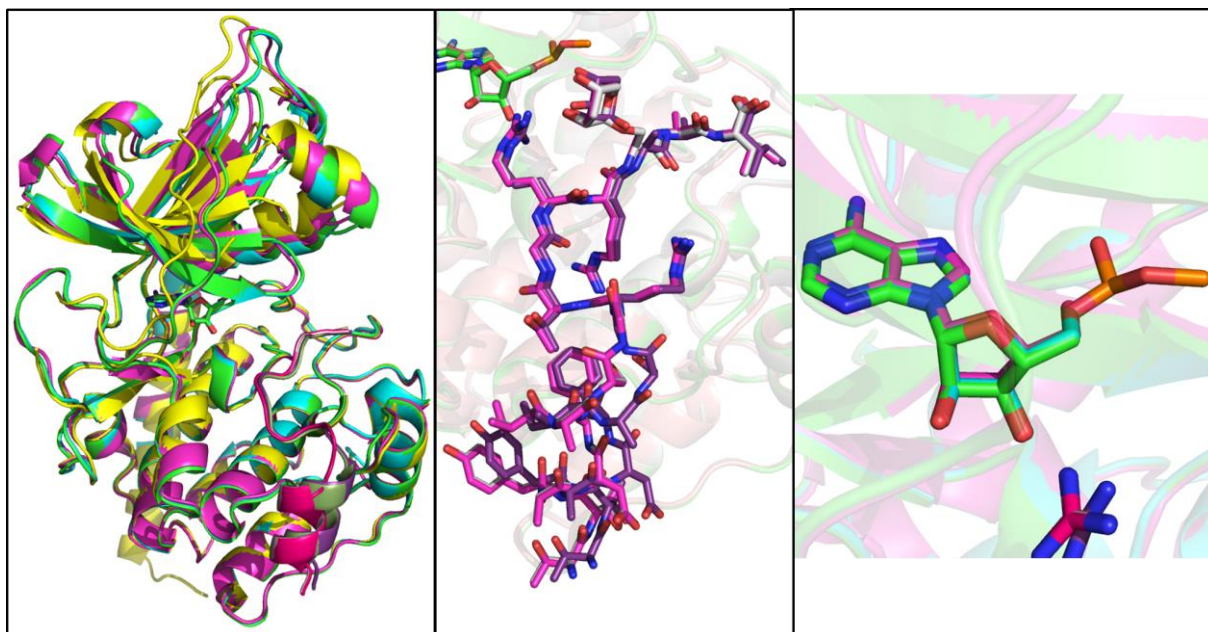


Abbildung 77: Links gezeigt ist die Überlagerung der Komplexstrukturen in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² (PKA in Cartoon-Darstellung gelb, Peptid blaugrün, PDB-Code: 6ERU), PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-AMP (PKA in Cartoon-Darstellung grün, Peptid lila, PDB-Code: 6ESA), PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-ADP (PKA in Cartoon-Darstellung türkis, Peptid grau, PDB-Code: 6EM7) und PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-ATP (PKA in Cartoon-Darstellung rosa, Peptid violett, PDB-Code: 6EMA). In der mittleren Abbildung ist die Überlagerung der Kristallstrukturen von PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-AMP, PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-ADP und PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-ATP in Ausschnittsvergrößerung auf die Peptide in Stick-Darstellung gezeigt. In der rechten Abbildung ist der überlagerte Bindungsmodus von AMP in der PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-AMP-Komplexstruktur, ADP in der PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-ADP-Komplexstruktur und ATP in der PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-ATP-Komplexstruktur gezeigt. Die Phosphatengruppen der Adenosinphosphate sind größtenteils fehlgeordnet.

Es zeigte sich, dass erneut bei Bindung eines Adenosinphosphates eine Verschiebung des Glycin-reichen *Loops* in Richtung der *hinge*-Region stattfindet. In den Strukturen mit AMP und ADP bleibt die Orientierung des Peptides gleich, in der Struktur mit ATP kommt es dagegen zu einem Peptid-Flip an Ser¹², der zu einer Verschiebung des α -helicalen Teils des inhibitorischen Peptids führt.

Der Bindungsmodus der Phosphate kann nicht beurteilt werden, da sie in hohem Maße fehlgeordnet vorliegen. Die Interaktionen zwischen der ATP- und der Peptid-Bindetasche ist in Abbildung 78 gezeigt.

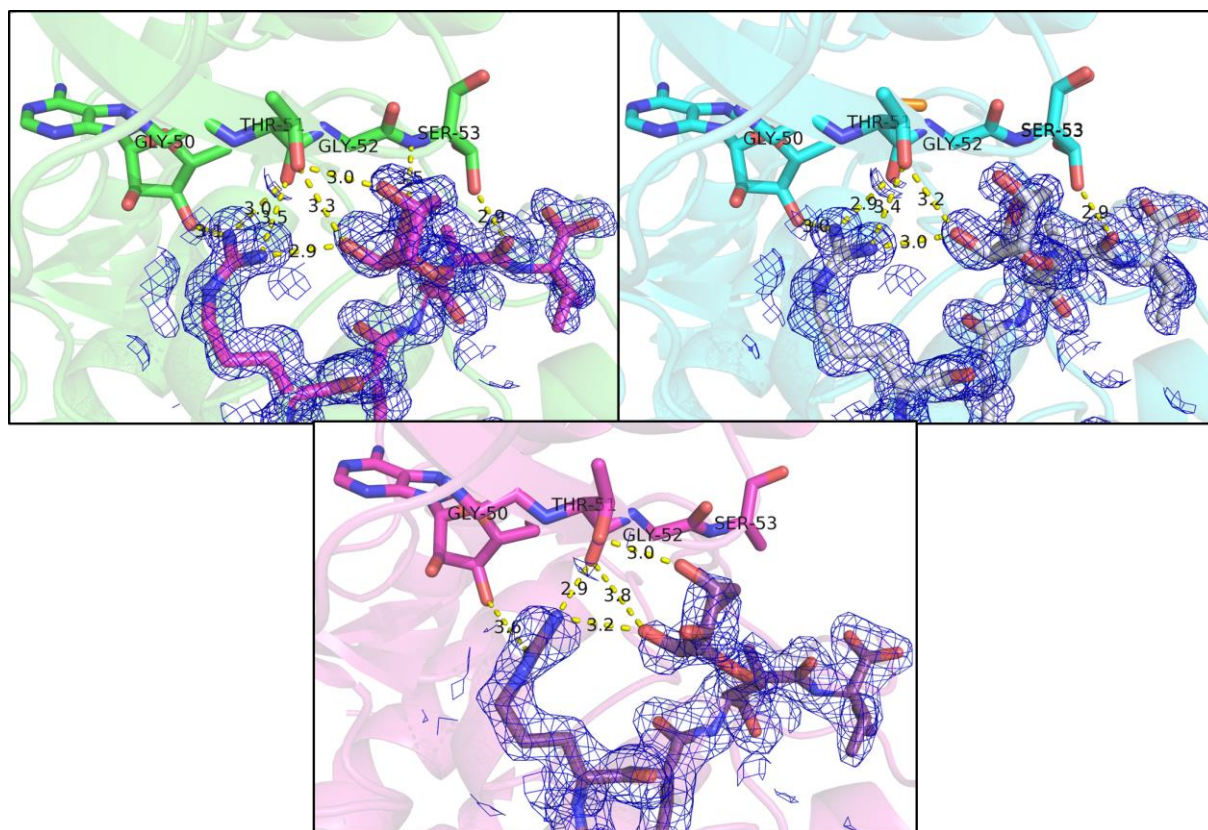


Abbildung 78: Links oben ist die Interaktion der ATP- und Peptid-Bindetasche in der PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-AMP-Komplexstruktur (PKA in Cartoon-Darstellung grün, Peptid in Stick Darstellung lila, PDB-Code: 6ESA) gezeigt.

Rechts oben ist die Interaktion der ATP- und Peptid-Bindetasche in der PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-ADP-Komplexstruktur (PKA in Cartoon-Darstellung türkis, Peptid in Stick-Darstellung grau, PDB-Code: 6EM7) gezeigt. Die Seitenkette von Ser⁵³ ist hierbei fehlgeordnet. Unten ist die Interaktion der ATP- und Peptid-Bindetasche in der PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-ATP-Komplexstruktur (PKA in Cartoon-Darstellung lila, Peptid in Stick Darstellung violett, PDB-Code: 6EMA) gezeigt. Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt

Bei der Betrachtung der Interaktionen wurde deutlich, dass PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² in Komplex mit AMP und ADP denselben Bindungsmodus aufweist.

Der Hauptteil der Interaktionen zu den Adenosinphosphaten findet über Arg¹⁸ statt, dass Wasserstoffbrückenbindungen zum Zucker in den Adenosinphosphaten eingeht. Die Ribosen des Peptides gehen dagegen größtenteils eine Interaktion mit dem Glycin-reichen *Loop* ein, vor allem mit Thr⁵¹.

In der Komplex-Struktur von PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-ATP wird Arg¹⁸ des Peptides verkippt, so dass die Interaktion zum Zucker von ATP geschwächt wird und mit einem Abstand von 3,6 Å an der Grenze zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke liegt. Die Interaktionen zwischen der Ribose und dem Glycin-reichen *Loop* werden dagegen nur unwesentlich verändert. Da sich in den Komplex-Strukturen von PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² gezeigt hatte, dass ATP in den Kristallisationsbedingungen zu ADP hydrolysiert werden kann, ist es denkbar, dass in den Komplexstrukturen mit PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² ebenfalls eine Hydrolyse stattgefunden hat und statt ATP ADP in den Strukturen vorliegt. Da die Phosphate fehlgeordnet vorliegen, lässt sich die Hydrolyse nicht ausschließen, da jedoch in den erhaltenen Strukturen von PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-ADP und PKA-PKI(RBS²⁰)⁵⁻²²-ATP das Peptid mit etwas abweichenden Orientierungen vorliegt, wurde jedoch vermutet, dass keine oder nur partielle Hydrolyse stattgefunden hatte.

Obwohl die Strukturen der Komplexe mit den Adenosinphosphaten, insbesondere AMP und ADP sehr gute Auflösungen aufwiesen (1,31 respektive 1,24 Å), waren die Phosphate hoch fehlgeordnet. Es ist unwahrscheinlich, dass die Adenosinphosphate nur unvollständig populierte sind und deshalb die Phosphate nur unvollständige Elektronendichte zeigen, da die sichtbaren Adenosin-Bereiche zu einer Besetzung von 100 % verfeinert werden konnten. Ebenfalls waren die Adenosinphosphate in den Strukturen mit PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² trotz einer geringeren Konzentration in den Kristallisationsansätzen vollständig sichtbar. Es scheint so, als würde die Ribose in PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² zu einer Verschlechterung der Interaktionen zu den Phosphaten führen, vor allen im Komplex mit ATP, in der das γ -Phosphat sehr nah am Peptid liegen müsste. In diesem Komplex nimmt das Peptid eine leicht veränderte Orientierung ein, die vermutlich zu einer Verschlechterung der Interaktion von Arg¹⁸ mit dem Zucker von ATP führt. Dies erklärt auch die im Gegensatz zu den anderen PKI⁵⁻²²-Varianten verschlechterte Affinität in Anwesenheit von ATP. Trotz der hohen Fehlordnung der Phosphate lässt sich feststellen, dass keinerlei Verknüpfung der Ribose mit den Phosphaten stattfindet. Die Ribosen, die in den Strukturen ohne Adenosinphosphate fehlgeordnet vorliegen, sind in den Strukturen mit Adenosinphosphaten sichtbar.

Dies liegt vermutlich daran, dass der Glycin-reiche *Loop* bei Bindung eines Adenosinphosphats herabgezogen wird und dadurch nahe genug an das Peptid herankommt, um Wasserstoffbrückenbindungen zu der Ribose auszubilden.

Diese fixieren die Ribose in einer vorteilhaften Konformation und verringern somit die Flexibilität und den Grad der Fehlordnung. Diese Konformation zeigt allerdings deutlich, dass keine Interaktion zu den Phosphaten stattfindet. Somit ist PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² nicht geeignet für die Verknüpfung von ATP- und Peptid-Bindetasche über die Interaktion von Ribose und Phosphaten.

6.8.4 Versuche zur Interaktion von Adenosinphosphaten mit PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²²

Die Einführung der Aminosäure BAR an Position 18 erschien vorteilhaft für die Verknüpfung mit dem Ribosering der Adenosinphosphate. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Ribosaminosäuren sollte in diesem Fall der zentrale Zucker der Adenosinphosphate eine Verknüpfung mit der in BAR enthaltenen Boronsäure eingehen. Als Ort der Mutation wurde Position 18 gewählt, da Arg¹⁸ im nativen PKI⁵⁻²² die meiste Interaktion zu den Adenosinphosphaten eingeht. Die Kristallisationsansätze wurden sowohl mit AMP, als auch mit ADP und ATP sowohl mit LC-Puffer und LC55/10-Puffer durchgeführt, jedoch konnten keinerlei Kristalle für die Komplexe mit ADP und ATP erhalten werden. Für den Komplex mit AMP wurden zwei Kristalle erhalten, von denen jeweils ein Datensatz gesammelt werden konnte. Interessanterweise wiesen die aus den Kristallen erhaltenen Strukturen trotz Entnahme aus der selben Kristallplatte Unterschiede auf. Eine der Strukturen enthielt zwar das Peptid mit fehlgeordneter BAR-Seitenkette, jedoch kein AMP. Die zweite Struktur hingegen enthielt dagegen AMP, jedoch keinerlei PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²². Es scheint so, als würden AMP und das Peptid einen starken sterischen Konflikt miteinander eingehen und eine gemeinsame Bindung daher ausschließen. Wird AMP in der ATP-Bindetasche gebunden, so kann sich die BAR-Aminosäure so schlecht in der Peptid-Bindetasche einfügen, dass die Bindung des gesamten Peptids verhindert wird. Wird das Peptid dagegen gebunden, so zeigt die BAR-Aminosäure höchstwahrscheinlich in die ATP-Bindetasche und blockiert somit die Bindung von AMP. Dies erklärt ebenfalls die nicht messbare Affinität von PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² in den Bindungsassays in Anwesenheit von ATP. Eine weitere Aussage über die Strukturen konnte jedoch nicht gemacht werden.

6.9 Fazit zur Verknüpfung von Adenosinphosphaten mit Ribo- und Boronsäure-Aminosäuren

Im Rahmen der Arbeit wurden drei verschiedene Konzepte zur Verknüpfung der Peptid-Bindetasche und Adenosinphosphaten getestet: In Komplexen mit PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² wurde auf einen ligandeninduzierten Effekt gehofft, der zu einer Neuorientierung der Phosphate sorgt. Dieser Effekt trat jedoch nicht ein, weshalb keine neuartigen vorteilhaften Interaktionen ausgebildet wurden. In Komplexen mit PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² wurde eine Verknüpfung der Ribose im inhibitorischen Peptid und der Phosphate im Cofaktor angestrebt, die durch die räumliche Nähe der Ribose und β - beziehungsweise γ -Phosphat ermöglicht werden sollte. In den Komplexstrukturen wurde dagegen keine Verknüpfung beobachtet, sondern nur eine Fehlordnung der Phosphate, die vermutlich aus unvorteilhaften Interaktionen mit den Ribosen resultieren. Letzlich wurde in Komplexen mit PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² versucht, den Zucker in den Adenosinphosphaten mit einer Boronsäure kovalent zu verknüpfen. Es zeigte sich jedoch, dass die hierbei verwendete um eine Boronsäure verlängerte Aminosäure BAR eine so ungünstige Interaktion mit den Adenosinphosphaten ausbildet, dass entweder das Peptid, oder das Adenosinphosphat, jedoch nicht beide gleichzeitig in der Bindetasche vorliegen. Somit wurden leider alle Konzepte zur Verknüpfung der Peptide mit den Adenosinphosphaten widerlegt.

6.10 Versuche zur Kristallisation mit Fragmenten

Im Rahmen der Arbeit konnten verschiedene PKI⁵⁻²²-Variationen ermittelt werden, deren Ribosen in Richtung der ATP-Bindetasche orientiert waren und die als potentiell geeignet zur Verknüpfung der ATP- und der Peptid-Bindetasche bewertet wurden. Dabei wurde vor allem Dingen PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² als aussichtsreiches PKI-Derivat beurteilt, da der Ort der Variation RBS¹⁸ im nativen Peptid am stärksten mit ATP in Interaktion tritt und somit die Bindetaschen in einem ausgeprägten Kontakt miteinander stehen. Weiterhin zeigte sich bei der Strukturaufklärung des PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-BFS-Komplexes, dass BFS eine neue Orientierung in Richtung der Ribose einnimmt, was für eine vorteilhafte Interaktion nahelegt.

Obwohl PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² als sehr aussichtsreich erschien, konnte mit den Fasudil-Derivaten BFS und BFF keinerlei kovalente Verknüpfung mit dem PKI-analogen Peptid erreicht werden.

Eine Vermutung weshalb die Verknüpfung nicht funktionierte war, dass die Fasudil-Derivate keine optimale Geometrie zur Reaktion mit der Ribose einnehmen können, was durch die Fixierung des Isochinolin-Rings an der *hinge*-Region verursacht wird. Deshalb wurde versucht ein Komplex aus PKA, PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² und 4-Bromphenylboronsäure zu kristallisieren. 4-Bromphenylboronsäure ist deutlich kleiner als die Fasudilderivate und kann einfacher eine vorteilhafte Geometrie zur Reaktion mit der Ribose einnehmen. Weiterhin ist die Boronsäure durch das in *para*-Position stehende Brom elektronenverarmt und sollte die Reaktion der Ribose mit der Boronsäure unter Aufweitung der Konfiguration am Bor erleichtern.

Letztlich wurde dieses Fragment auch deshalb gewählt, da Brom aufgrund seines hohen Streuvermögens deutlich in den Kristallstrukturen sichtbar wäre, sodass die Bindung eines solchen Fragmentes einfacher detektiert werden kann. Die Komplexe wurden dabei versucht, mit einer Konzentration der 4-Bromphenylboronsäure von bis zu 28 mmol · L⁻¹ zu kristallisieren. Dies entspricht der maximalen Löslichkeit in dem verwendeten Kristallisationspuffer, die experimentell bestimmt wurde. Höhere Konzentrationen hätten den Einsatz von Dimethylsulfoxid erfordert, das möglicherweise veränderte Kristallisationseigenschaften bedingt hätte. Deshalb wurden keine höheren Konzentrationen als 28 mmol · L⁻¹ verwendet. Bei diesen Konzentrationen konnte das Fragment jedoch nicht in der Elektronendichte beobachtet werden. Es schien somit weder an die Ribose, noch an andere Bereiche der PKA zu binden.

Da die Ribose in der PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²²-Komplexstruktur eine Wasserstoffbrückenbindung zu Glu¹²⁷ ausbildete, wurde vermutet, dass die Ribose sich nicht mit 4-Bromphenylboronsäure verknüpfte, da die Hydroxygruppen durch die Wasserstoffbrückenbindung zu Glu¹²⁷ blockiert waren und nicht für die Reaktion zur Verfügung standen. Durch Messungen von Dr. ROMINA KIRSCHNER im Arbeitskreis Geyer war bekannt, dass Ribosen eine Reaktion mit den Schwermetall-Ionen Lanthan und Yttrium eingehen. Um zu überprüfen, ob die Ribose von PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² in der Bindetasche blockiert ist, wurde somit mittels *Soaking* Yttriumchlorid und Lanthanchlorid in die Kristalle von PKA- PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² eingeführt. Dabei mussten die Konzentration der Schwermetallsalze und die Zeit, die der Kristall in der Schwermetalllösung verweilte, zuerst optimiert werden.

Zu geringe Konzentrationen oder zu kurze Verweildauer in der Lösung hätten für fehlende Bindung im Kristall geführt, während zu hohe Konzentrationen oder zu lange Verweildauer in der Lösung für den Verlust der Diffraktionsfähigkeit des Kristalls geführt hätten. Die optimale Konzentration der Schwermetallsalze wurde mit $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und die optimale Verweildauer in der Lösung mit 2 Stunden bestimmt. Jedoch konnten weder Yttrium noch Lanthan in der Elektronendichte der Strukturen nachgewiesen werden. Die Ribose schien somit tatsächlich durch die Wasserstoffbrückenbindung mit Glu¹²⁷ für die Reaktion blockiert zu sein.

Neben den fragmentbasierten Versuchen zur Verknüpfung der Ribose mit solchen niedermolekularen Bausteinen wurde ebenfalls versucht, Komplexe aus PKA-PKI⁵⁻²⁴ und Adamantylamin zu kristallisieren. Adamantylamin sollte hierbei als Fragmentsonde dienen, um eventuelle Bindungsplätze für Adamantyle zu identifizieren. Wäre eine Bindungsstelle nahe der Peptid-Bindetasche gefunden worden, so hätte versucht werden können, die Adamantyl-Seitenketten von variierten peptidischen Liganden in diese Bindungsstelle auszurichten. Zu diesem Zeitpunkt lag noch kein Kristallisationsprotokoll für PKA-Kristalle ohne peptidische Liganden vor, weshalb keine Kristallisationen mit Adamantylamin ohne peptidische Liganden durchgeführt wurde. Die Kristallisation ohne peptidische Liganden hätte es ermöglicht, etwaige Bindungsplätze für Adamantyle auch innerhalb der Peptid-Bindetasche zu identifizieren. Da durch die Molekulardynamik-Simulationen (siehe Kapitel 2) jedoch bereits Strukturvorschläge für Adamantyl-Peptide vorlagen, wurde die Kristallisation nicht erneut ohne peptidische Liganden durchgeführt. Leider konnte selbst bei hohen Konzentrationen von Adamantylamin in den Kristallisationsansätzen (bis zu $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) keinerlei Elektronendichte für Adamantylamin in den Strukturen gefunden werden.

6.11 Einführung von Adamantyl-Aminosäuren

Die Kristallisation der PKI⁵⁻²²-Variationen mit Adamantyl-Aminosäuren gestaltete sich problematisch. Weder unter den normalen Kristallisationsbedingungen, noch bei höheren oder niedrigen Konzentrationen von Methanol oder verändertem pH-Wert ließen sich Kristalle erhalten. Die Kristallisationstropfen blieben entweder unverändert oder es trat Präzipitatsbildung auf. Weder die Erhöhung der Kristallisationstemperatur, noch die Verwendung unterschiedlicher Proteinchargen veränderte dieses Verhalten.

Versuche, die Kristallisation mittels *Seeding*, sowohl manuell über die Verwendung eines Pferdehaars, als auch maschinell am MarXtal in einem *Microseeding-Screen* zu verbessern, zeigten keine Effekte. Weiterhin wurde versucht, mittels *Soaking* die Adamantyl-Aminosäure-Peptide in *apo*-Kristalle der PKA einzuführen. Dies führte jedoch zur sofortigen Zerstörung der Kristalle. Weiterhin wurde versucht, Kristalle von PKA-PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²², die bereitwillig erhalten werden konnten, im Kristallisationstropfen der Adamantyl-Aminosäure-Peptide einzudiffundieren. Da PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² eine sehr geringe Affinität aufweist, wurde gehofft, dass bei den *Soaking*-Versuchen PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² durch die Adamantyl-Aminosäure-Peptide verdrängt werden würde.

Jedoch zeigte sich, dass nach kurzer Zeit eine Rissbildung in den Kristallen zu sehen war. Die Kristalle wurden deshalb nur 20 Minuten getränkt, da nach dieser Zeit die Rissbildung erst begann. Trotz des Entnehmens der Kristalle vor visueller Nachweisbarkeit dieser Rissbildung waren die meisten Kristalle bereits nach dieser Zeit so stark geschädigt, dass sie keine Datensätze mehr lieferten. Kristalle, von denen ein Datensatz erhalten werden konnte, enthielten nur das bereits vor dem *Soaking* gebundene PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²². Es wurde somit vermutet, dass der Kristall bei Bindung der Adamantyl-Peptide zerstört wird und nur Kristalle unversehrt bleiben, in denen das Adamantyl-Peptid nicht in der Lage war PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² zu verdrängen.

Weiterhin wurde versucht, die Adamantyl-Peptide unter Zugabe von 5 mmol · L⁻¹ Fasudil zu kristallisieren. Fasudil ist als *hinge*-Binder in der Lage die einzelnen Domänen der PKA zu stabilisieren und kann somit die Bildung von geordneten Kristallen erleichtern. Unter diesen Bedingungen konnte für ein einziges Adamantyl-Peptid eine Kristallstruktur in Komplex mit der PKA und Fasudil erhalten werden. Diese ist in Abbildung 79 gezeigt.

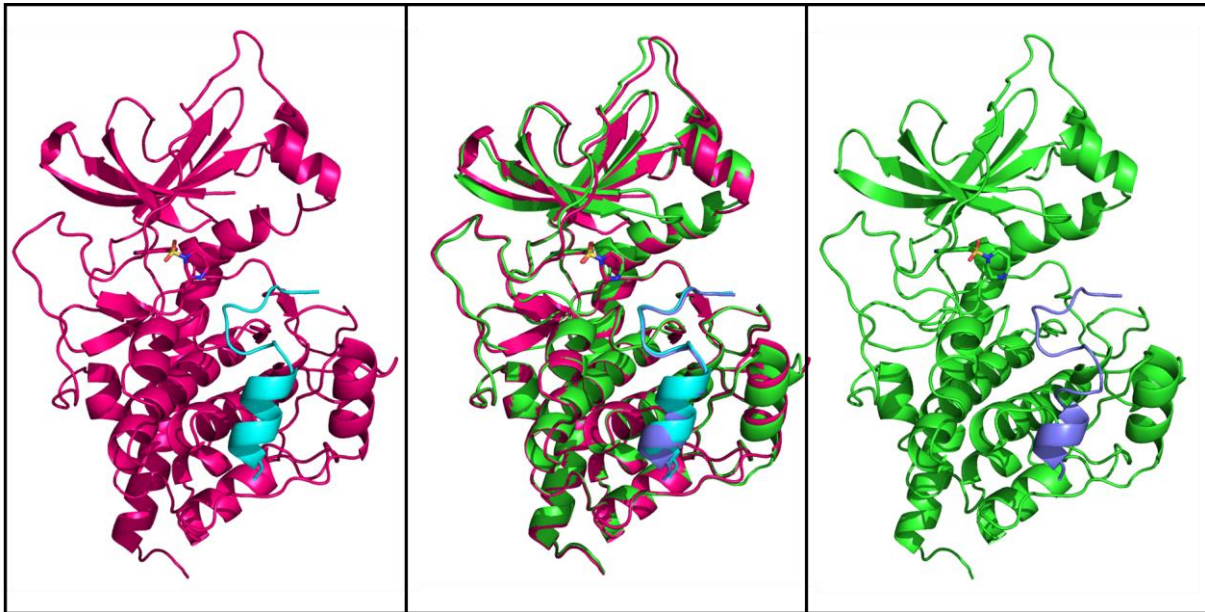


Abbildung 79: Vergleich der Komplexstrukturen in Cartoon-Darstellung von PKA-PKI⁵⁻²²-Fasudil (links, PKA weinrot, Peptid türkis, PDB-Code: 6ERW) und PKA-PKI((S)-SC1⁶)⁵⁻²²-Fasudil (rechts, PKA grün, Peptid blau, PDB-Code: 5OK3). In der Mitte ist die Überlagerung beider Kristallstrukturen gezeigt. Fasudil ist in allen Darstellungen in der Stick-Darstellung gezeigt, wobei die Kohlenstoffe analog zur PKA gefärbt sind.

Beim Vergleich der Strukturen zeigte sich, dass die Bindung von PKI((S)-SC1⁶)⁵⁻²² und Fasudil nur zu einer geringen Änderung in der Konformation der PKA im Vergleich zum PKA-PKI⁵⁻²²-Fasudil-Komplex führt. Der Glycin-reiche *Loop* ist in der PKA-PKI⁵⁻²²-Fasudil-Komplex-Struktur zum Teil fehlgeordnet, weshalb kein genauer Vergleich möglich ist, es scheint jedoch so, als würde er in der PKA-PKI((S)-SC1⁶)⁵⁻²²-Fasudil-Komplexstruktur geringfügig in Richtung des Peptides gezogen. Fasudil ist in beiden Strukturen identisch gebunden. Die Betrachtung der Peptide zeigt, dass in der PKA-PKI((S)-SC1⁶)⁵⁻²²-Fasudil-Struktur die N-terminale Helix des Peptides etwas aufgeweitet wird. Ein genauer Vergleich der Peptide ist in Abbildung 80 gezeigt.

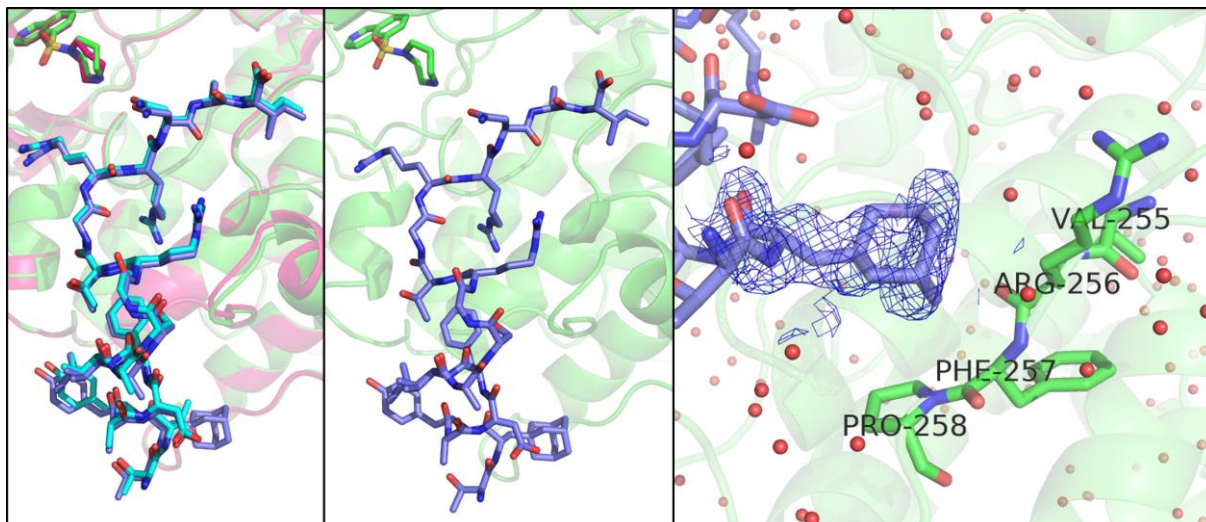


Abbildung 80: Links ist der Vergleich der Peptide in den Komplexstrukturen von PKA-PKI⁵⁻²²-Fasudil (PKA in Cartoon-Darstellung weinrot, Peptid in Stick-Darstellung türkis, PDB-Code: 6ERW) und PKA-PKI((S)-SC1⁶)-Fasudil (PKA in Cartoon-Darstellung grün, Peptid in Stick-Darstellung blau, PDB-Code: 5OK3) gezeigt. In der Mitte ist die Orientierung des Peptides in der PKA-PKI((S)-SC1⁶)-Fasudil-Komplexstruktur gezeigt. Fasudil ist in allen Darstellungen in der Stick-Darstellung gezeigt, wobei die Kohlenstoffe analog zur PKA gefärbt sind. Rechts gezeigt ist eine vergrößerte Darstellung der Seitenkette der Adamantyl-Aminosäure und deren Umgebung. Wassermoleküle sind als rote Kugeln angegeben. Die 2mF_o-F_c-Elektronendichte bei 1 σ ist als blaues Netz gezeigt.

Bei genauerer Betrachtung wurde klar, dass die Aufweitung der Helix innerhalb des Peptides nur schwach ausgeprägt ist und die Orientierung der Seitenketten weiterhin wie in PKI⁵⁻²² vorliegen. Die Betrachtung der Adamantyl-Aminosäure zeigte, dass keine vorteilhaften Interaktionen zwischen PKA und Adamantyl ausgebildet werden. Der Adamantylrest zeigt in eine hauptsächlich polare Tasche und verdrängt größtenteils die Wassermoleküle um sich herum. Im nativen PKI⁵⁻²² liegt an dieser Position ein Threonin vor, dass polare Interaktionen zum Protein und zu Wassermolekülen eingehen kann. Diese Interaktionen gehen vollständig verloren.

6.12 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit konnten 34 diverse Kristallstrukturen bestimmt werden. Die Liste dieser Strukturen ist in Tabelle 10 zu finden, sowie während die Sequenz aller PKI-Varianten in Abbildung 30 gezeigt ist. Diese Strukturen zeigten, dass viele Riboserin und Ribothreonin-Variationen des PKI⁵⁻²² toleriert werden, die Bindungsmodi der Peptide werden nur unwesentlich verändert. Obwohl mehrere der peptidischen Variationen geeignet für eine Verknüpfung mit *Linkern* in der ATP-Bindetasche schienen, konnten weder mit Boronsäuren und Ribosen, Ribosen und Phosphaten, Boronsäuren und Zuckern oder Ribosen und Schwermetall-Ionen Verknüpfungen erzielt werden. Die Reaktivität der Boronsäurefasudile und deren Verwendbarkeit zur Ausbildung von *Self-Assembly*-Komplexen konnte dagegen bestätigt werden. In Strukturen, in denen Arg¹⁸ des peptidischen Liganden ausgetauscht war kam es zu einer Neuorientierung der Boronsäuregruppe in BFS in Richtung von Glu¹²⁷ der PKA. Im Falle eines Austauschs von Arg¹⁸ gegen BAR kann sich das Bor nahe genug an Glu¹²⁷ anlagern, sodass die Sauerstoffgruppe des Glutamats nukleophil an das Bor angreifen kann. Es kommt somit zu einer kovalenten Verknüpfung von BFS an Glu¹²⁷, das mit einer Koordinationserweiterung am Bor einhergeht. Für die Variation von PKI⁵⁻²² mit Adamantyl-Aminosäuren konnte nur eine Struktur ermittelt werden. Diese Struktur zeigte jedoch, dass keinerlei vorteilhafte Interaktionen zwischen Adamantyl und PKA eingegangen wurden. Da dies jedoch nur die Struktur einer einzigen der vier Adamantyl-Variationen war, konnte keine allgemeine Aussage über die Vorteilhaftigkeit solcher Variationen gemacht werden.

7. Korrelation der Assay-Ergebnisse und der Kristallstrukturen

In den Bindungsassays konnte festgestellt werden, dass die Affinität der Peptide deutlich von der Anwesenheit des ATP abhängig ist. Ein Grund hierfür wurde in den Strukturen gefunden: die Koordination von Arg¹⁸ an den Zuckerbaustein des ATPs. Dies scheint zu einer deutlichen Steigerung der Affinität der Peptide zu führen. Dies erklärt auch, warum die Affinität der Variationen PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² und PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² so gering ausfällt, denn diese wiesen kein Arg¹⁸ mehr auf. Bei der Variation PKI(RBS²⁰)⁵⁻²², die in den Assays mit ATP eine geringere Affinität als ohne ATP aufwies konnte in den Strukturen beobachtet werden, dass es zu unvorteilhaften Interaktionen zwischen Ribose und ATP kommt, die zu einer Veränderung des Bindungsmodus im Peptid führen.

Trotz Ausbildung neuer Interaktionen der Ribose mit dem Glycin-reichen *Loop*, bedingt die Verschlechterung der Interaktion zwischen Arg¹⁸ und ATP, sowie der Peptid-Flip an Position 12 insgesamt für einen Verlust an Affinität. Die Verbesserung der Affinität ohne ATP konnte dagegen aufgrund des hohen Grades an Fehlordnung der Ribose nicht erklärt werden. Es konnte ebenfalls eine Erklärung für den Verlust an Affinität bei der Verkürzung von PKI⁵⁻²⁴ auf PKI⁵⁻²² gefunden werden; der auftretende Peptid-Flip, der in allen verkürzten Varianten vorliegt scheint für diesen allgemeinen Verlust an Affinität verantwortlich zu sein.

Für die restlichen peptidischen Varianten konnten keine Korrelationen zwischen Assay-Ergebnissen und Kristallstrukturen ermittelt werden; für die Variationen PKI(RBS¹³)⁵⁻²², PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²², PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²² und PKI(RBS²¹)⁵⁻²² konnten zwar Kristallstrukturen erhalten werden, die Änderung im Bindungsmodus der Peptide war jedoch meist sehr gering. Änderungen in der Hydrathülle wären denkbar, da jedoch die meisten Strukturen eine Auflösung schlechter als 1,50 Å aufwiesen, ist eine Beurteilung der Position der Wassermoleküle nur unvollständig möglich. Für die Variation PKI(RBS¹⁹)⁵⁻²² konnte dagegen keinerlei Kristallstruktur erhalten werden, da diese Variante keine Kristalle lieferte.

Auch für die Serie der Adamantyl-Peptide konnten nur wenige Korrelationen ermittelt werden, da nur eine einzige Struktur bestimmt werden konnte. Diese Struktur war ein Komplex mit PKI((S)-SC1⁶)⁵⁻²², dass in den Bindungsassays nur stark reduzierte Affinität aufwies. Es zeigte sich, dass das Adamantyl in eine polare Bindungstasche zeigt und somit aufgrund seines eigenen stark unpolaren Charakters unvorteilhaft platziert ist. Dies wäre eine mögliche Erklärung für diesen Affinitätsverlust.

V Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten unter Zuhilfenahme von bekannten Bedingungen zu rekombinanter Produktion und Aufreinigung der PKA, sowie deren Kristallisation, ein qualitativer Bindungsassay und ein quantitativer Bindungsassay etabliert werden. Der qualitative *Thermal-Shift*-Assay vermittelt einen Hinweis auf die Stabilisierung und indirekt auf die Stärke der Bindungsaffinität anhand der die Änderung des Schmelzpunktes des Proteins bei Zugabe eines Liganden. Der quantitative mikroskalierte Thermophorese-Assay dagegen erlaubte direkt die Bestimmung der Bindungsaffinität. Da ab der Mitte der Arbeit kein Gerät zur Messung des *Thermal-Shift*-Assays mehr verfügbar war, konnten die Schmelzpunktverschiebungen nur für sechs Peptide, drei Fasudilderivate und die Adenosinphosphate AMP, ADP und ATP gemessen werden. Nach der Bestimmung der Bindungsaffinitäten im mikroskalierten Thermophoreseassay, die für alle 14 Peptide, drei Fasudilderivate und die Adenosinphosphate gemessen werden konnte, zeigte sich, dass Schmelzpunktverschiebung und Affinität korrelierten. Ebenfalls wurde deutlich, dass die Bindungsaffinität der Peptide stark abhängig von der Anwesenheit des ATPs war. Die gemessenen Affinitäten für literaturbekannte Liganden eine gute Korrelation zu den aus der Literatur bekannten Werten auf. In der Serie der Ribo-Aminosäure- und Boronsäure-Aminosäure-Peptiden konnten Peptide identifiziert werden, die mit dem nativen PKI⁵⁻²² vergleichbare Affinitäten aufwiesen, sowie solche, deren Bindungsaffinitäten schlechter waren. Dabei wurde die Affinität am meisten verschlechtert, wenn in der Nähe zum C-Terminus des Peptides, insbesondere zu Arg¹⁸ eine Variation vorgenommen wurde. In der Serie der Adamantyl-Aminosäure-Peptide wurden ebenfalls Peptide mit zum nativen PKI⁵⁻²² vergleichbaren Affinitäten und verschlechterten Affinitäten erhalten, im Gegensatz zur Serie der Ribo- und Boronsäure-Aminosäure-Peptide wurde dagegen auch ein Peptid erhalten, das eine deutlich bessere Affinität aufwies.

Weiterhin konnten 34 diverse Kristallstrukturen erhalten werden und die Bindung von zwei Fragmenten, sowie Yttrium- und Lanthan-Ionen konnten widerlegt werden, da der eingesetzte Ribosebaustein in Kontakte mit dem Protein eingebunden wurde. Für die Kristallisation mit Adenosinphosphaten konnten neue Kristallisationsbedingungen ermittelt werden, die die Toleranz hoher Konzentrationen von AMP, ADP und ATP zulassen und weiterhin Kristalle mit deutlich verbesserter Qualität ermöglichten.

Sowohl das Konzept der Verknüpfung von Boronsäuren mit Ribosen, als auch das Konzept der Verknüpfung von Boronsäuren mit dem Zucker von Adenosinphosphaten nach Art eines *Self-Assembly*-Komplexes konnte zumindest für die hier entworfenen und strukturell untersuchten Peptide widerlegt werden. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine kovalente Bindung einer Boronsäure an Sauerstofffunktionen in der Proteinumgebung grundsätzlich möglich ist, denn es wurde eine kovalente Verknüpfung des Boronsäure-Fasudils BFS mit der Carboxyfunktion der Aminosäure Glu¹²⁷ beobachtet. Dies zeigte die grundsätzliche Sinnhaftigkeit unseres Konzeptes auf, macht jedoch auch deutlich, dass das Design der Liganden noch deutliche Schwachstellen aufwies und sehr exakt passende Bindungsgeometrien erfordert.

Das Konzept der Einführung von Adamantyl-Aminosäuren konnte bewiesen werden, indem eine Kristallstruktur mit einem Adamantyl-Aminosäure-Peptid erhalten werden konnte. Zwar lässt sich für dieses Peptid keine Affinität in den Bindungsassays nachweisen, jedoch wurde deutlich, dass eine Bindung eines solchen Peptids an die PKA auch bei der reduzierten Affinität noch immer stattfindet.

VI Material und Methoden

1. Materialien

1.1 Chemikalien

Tabelle 11: Verwendete Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge.

Name	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth
10 % Tween 20	Nanotemper Technologies
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Roth
2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD)	Aldrich
4-Bromphenylboronsäure	Sigma-Aldrich
Adamantylamin Hydrochlorid	Roth
Adenosindiphosphat Natriumsalz (ADP)	Sigma-Aldrich
Adenosinmonophosphat Natriumsalz (AMP)	Sigma-Aldrich
Adenosintriphosphat Natriumsalz (ATP)	Sigma-Aldrich
Adenosintriphosphat Magnesiumsalz (ATP)	Sigma-Aldrich
Ammoniak 25 %	Riedel-deHaën
Ammoniumchlorid	Grüssing
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Anti-Foam A	Sigma-Aldrich
Bis (2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (Bis-Tris)	Sigma-Aldrich
Borsäure	Riedel-deHaën

Calciumchlorid	Roth
Chloramphenicol	Roth
Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Desoxyribonuclease II	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Eisenchlorid Hexahydrat	Riedel-deHaën
Ethanol 96 %	Riedel-deHaën
Ethyldiamintetraacetat Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Roth
Fasudil Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Fluorinert FC-70	Sigma-Aldrich
Glucose	Fischer Scientific
Glutardialdehyd 25 % in Wasser	Merck
Glycerin	ACROS Organics
Hefeextrakt	Roth
Imidazol	Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kobaltchlorid Hexahydrat	Merck/Fluka
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)pLysS kompetente Zellen	Novagen
Korasilon-Paste mittelviskos (Silikonfett)	Kurt Obermeier GmbH
Kupferchlorid Dihydrat	Sigma-Aldrich

Material und Methoden

Lactose	Roth
Lanthanchlorid	Fluka
Lithiumchlorid	Roth
Lysozym aus Hühnereiweiss	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat Hydrat	Roth
Manganchlorid Dihydrat	Roth
Methanol	Fischer Scientific
Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS (Amine Reactive)	Nanotemper Technologies
Natriumchlorid	Fischer Scientific / Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	Fluka
Natriummolybdat Dihydrat	Merck
Natriumselenit	VWR
Natriumsulfat Decahydrat	Roth
Nickelchlorid Hexahydrat	Roth
N-Octanoyl-N-methylglucamine (Mega8)	Sigma-Aldrich
Page Ruler Prestained Protein Ladder 10 to 180 kDa	Thermo Scientific
Protein Kinase A Inhibitor Fragment 5-24-Amid Trifluoroacetat	Sigma-Aldrich
Roti-Blue	Roth
Rotiphorese 10× SDS-PAGE (Lämmli-Puffer)	Roth

Salzsäure 32 %	Fluka
SYPRO Orange protein gel stain 5000x concentrate	Life technologies
<i>Tobacco-Etch-Virus</i> -Protease-Lösung (TEV-Protease)	Arbeitskreisbestände
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) Hydrochlorid	Roth
Trypton / Pepton aus Casein	Roth
Yttriumchlorid	Sigma-Aldrich
Zinksulfat Heptahydrat	Merck

Sämtliche mutierten peptidischen Liganden sowie die Fasudil-Derivate wurden von Dr. ROMINA KIRSCHNER vom Arbeitskreis GEYER im Rahmen ihrer Dissertation synthetisiert und im Rahmen der Kooperation zur Verfügung gestellt. Das zur Transformation benötigte Plasmid wurde von Dr. B. WIENEN-SCHMIDT übernommen.^[35] Kristalle der Proteinkinase A, die keinerlei Liganden enthielten wurden von C. SIEFKER übernommen.

1.2 Geräte

Tabelle 12: Verwendete Geräte in alphabetischer Reihenfolge.

Gerät	Hersteller
1.88" Crystal Clear Sealing Tape (Shark-Tape)	Hampton Research
Agarplatten	Arbeitskreisbestände
Autoklav	Fedegari Autoklavi SpA
CryoCaps (Plain)	Molecular Dimensions Limited
Crychem Sitting Drop Plate	Hampton Research
Deckgläser Durchmesser 22 mm	Menzel-Gläser
EasyXtal 15 Well Tool	Qiagen

Emulsiflex C 3	Avestin
Feinwaage CP2P	Sartorius
Feinwaage Typ 414	August Sauter KG
Vivaspin 20, MWCO 30,000	Sartorius
Vivaspin 6, MWCO 30,000	Sartorius
FPLC ÄKTAbasic	GE Healthcare Europe
FPLC ÄKTAprime	GE Healthcare Europe
Glasdouncer 100 mL	Kontes
His-Trap HP	GE Healthcare
IQ5-Cycler	Bio-Rad
Magnetic CryoVials	Molecular Dimensions Limited
Magnetrührer	Heidolph MR Hei-Standard
Magnetrührer	IKA RH basic 2
MAR345 Image Plate Detektor mit Iµ Mikrofokusröhre	MAR-Incoatec
Microseal C PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad
Mini-Incubator Brutschrank	Labnet
Minizentrifuge	IKA mini G
Monolith NT.115	Nanotemper Technologies
Monolith NT.115 Capillary Selection Kit Microscale Thermophoresis Grade	Nanotemper Technologies
Monolith NT.115 Microscale Hydrophilic Treated Thermophoresis Grade	Nanotemper Technologies

Monolith NT.115 Premium Coated Microscale Thermophoresis Grade	Nanotemper Technologies
Monolith NT.115 Standard Treated Microscale Thermophoresis Grade	Nanotemper Technologies
MonoS 10/100 GL	GE Healthcare
Mounted CryoLoop unterschiedlicher Größen	Hampton Research
Multipette plus	Eppendorf
Multiplate 96-Well PCR Plates	Bio-Rad
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Nunc Cryo Tubes	Sigma Aldrich
Peristaltikpumpe Pump P - 1	Pharmacia Biotech
pH-Meter Five easy	Mettler Toledo
Pipetten unterschiedlicher Größen	Eppendorf
Rotilabo-Spritzenfilter CME, unsteril, Porengröße 0,8 µm	Roth
Schüttelinkubator Innova 4230	New Brunswick
Schüttelinkubator Innova 43	New Brunswick
Schüttelinkubator Polymax 1040	Heidolph
SDS-Gelelektrophorese-geeignete Gele	Arbeitskreisbestände
SDS-Gelelektrophoresekammer Mini-V8*10	Life Technologies /BioRad
Sterilbank 8511	Köttermann
Sterilfilter Rapid-Flow Bottle Top Filter 0,2 µm	Thermo Scientific
Sterilfilter Ultrafree MC 0,22 µm Durapore	Merck Millipore
Superloop 50 mL	GE Healthcare

Synchrotronquelle P13 Hamburg	DESY-EMBL Hamburg
Synchrotronquelle ID_29	ESRF Grenoble
Synchrotronquelle MX_14.1	HZB BESSY II
Synchrotronquelle MX_14.2	HZB BESSY II
Synchrotronquelle MX_14.3	HZB BESSY II
Thermomixer comfort 2 mL	Eppendorf
Tischzentrifuge	Roth
Ultraschall Branson Sonifier 250	Branson
Vortexer REAX-1	Heidolph
Vortexer VF2	Janke&Kunkel
Waage PCB-3500-2	Kern
X8 PROSPECTOR mit I μ S Mikrofokusröhre APEX II CCD Detektor	Bruker
ZelluTrans Dialyseschlauch MWCO 12,000-14,000	Roth
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3	Heraeus
Zentrifuge Universal 16 R	Hettich

1.3 Lösungen, Puffer und Medien

Tabelle 13: Verwendete Lösungen, Puffer und Medien in alphabetischer Reihenfolge.

Name	Zusammensetzung
1,4-Dithiothreitol-Lösung 1 mol · L ⁻¹	30,85 mg DTT ad 2 mL mit demin. Wasser
1000× Trace Metal Stock	27,03 g Eisenchlorid Hexahydrat 4,44 g Calciumchlorid 3,24 g Manganchlorid Dihydrat 5,75 g Zinksulfat Heptahydrat 0,95 g Kobaltchlorid Hexahydrat 0,68 g Kupferchlorid Dihydrat 0,95 g Nickelchlorid Hexahydrat 0,97 g Natriummolybdat Dihydrat 0,69 g Natriumselenit 0,25 g Borsäure ad 1 L mit demin. Wasser
Ampicillin-Lösung	4,00 g Ampicillin Natriumsalz ad 40 mL mit demin. Wasser
Assay-Puffer für MST	1,19 g HEPES 0,58 g Natriumchlorid 0,03 g TCEP 0,10 g Magnesiumchlorid 0,50 mL 10 % Tween 20 ad 100 mL mit demin. Wasser Einstellen mit NaOH auf pH 7,0
Assay-Puffer für TSA	1,19 g HEPES 0,58 g Natriumchlorid 0,03 g TCEP 0,10 g Magnesiumchlorid ad 100 mL mit demin. Wasser Einstellen mit NaOH auf pH 7,0 Steril filtrieren
Assay-Puffer O1 für MST	1,19 g HEPES 2,92 g Natriumchlorid 0,03 g TCEP ad 100 mL mit demin. Wasser Einstellen mit NaOH auf pH 7,0 Steril filtrieren

Assay-Puffer O2 für MST	1,19 g HEPES 2,92 g Natriumchlorid 0,03 g TCEP 0,50 mL 10 % Tween 20 ad 100 mL mit demin. Wasser Einstellen mit NaOH auf pH 7,0 Steril filtrieren
ATP-Magnesiumsalz-Lösung für TSA 100 mmol · L ⁻¹	53,00 mg ATP Magnesiumsalz ad 1 mL mit demin. Wasser
ATP-Natriumsalz-Lösung für MST 20 mmol · L ⁻¹	11,00 mg ATP Natriumsalz ad 1 mL mit Assay-Puffer für MST
ATP-Natriumsalz-Lösung für TSA 100 mmol · L ⁻¹	55,22 mg ATP Natriumsalz ad 1 mL mit demin. Wasser
ATP-Natriumsalz-Lösung für TSA 50 mmol · L ⁻¹	27,61 mg ATP Natriumsalz ad 1 mL mit demin. Wasser
Aufschluss-Mix pro 8 L Medium in Expression	400 mL Puffer A 8 Tabletten Protease-Inhibitor Cocktail 1 Spatelspitze DNase II 1 Spatelspitze Lysozym
Bis-Tris-Puffer 1 mol · L ⁻¹	20,92 g Bis-Tris ad 100 mL mit demin. Wasser
Chloramphenicol-Lösung	1,40 g Chloramphenicol ad 40 mL mit Ethanol p.a.
Cryo-Puffer 16 %	1,00 mL MBT-Puffer 10,00 µL DTT-Lösung 1 mol · L ⁻¹ 10,00 µL EDTA-Lösung 0,1 mol · L ⁻¹ 375,00 µL LiCl-Lösung 2 mol · L ⁻¹ 1,60 mL Methanol ad 10 mL mit demin. Wasser 70/30 Verdünnen mit MPD
Cryo-Puffer 19 %	1,00 mL MBT-Puffer 10,00 µL DTT-Lösung 1 mol · L ⁻¹ 10,00 µL EDTA-Lösung 0,1 mol · L ⁻¹ 375,00 µL LiCl-Lösung 2 mol · L ⁻¹ 1,90 mL Methanol ad 10 mL mit demin. Wasser 70/30 Verdünnen mit MPD

Cryo-Puffer 55/10 16 %	1,00 mL MBT-Puffer 10,00 µL DTT-Lösung 1 mol · L ⁻¹ 10,00 µL EDTA-Lösung 0,1 mol · L ⁻¹ 275,00 µL LiCl-Lösung 2 mol · L ⁻¹ 50,00 µL MgCl ₂ -Lösung 2 mol · L ⁻¹ 1,60 mL Methanol ad 10 mL mit demin. Wasser 70/30 Verdünnen mit MPD
Cryo-Puffer 55/10 19 %	1,00 mL MBT-Puffer 10,00 µL DTT-Lösung 1 mol · L ⁻¹ 10,00 µL EDTA-Lösung 0,1 mol · L ⁻¹ 275,00 µL LiCl-Lösung 2 mol · L ⁻¹ 50,00 µL MgCl ₂ -Lösung 2 mol · L ⁻¹ 1,90 mL Methanol ad 10 mL mit demin. Wasser 70/30 Verdünnen mit MPD
Cryo-Puffer 75/10 16 %	1,00 mL MBT-Puffer 10,00 µL DTT-Lösung 1 mol · L ⁻¹ 10,00 µL EDTA-Lösung 0,1 mol · L ⁻¹ 375,00 µL LiCl-Lösung 2 mol · L ⁻¹ 50,00 µL MgCl ₂ -Lösung 2 mol · L ⁻¹ 1,60 mL Methanol ad 10 mL mit demin. Wasser 70/30 Verdünnen mit MPD
Cryo-Puffer 75/10 19 %	1,00 mL MBT-Puffer 10,00 µL DTT-Lösung 1 mol · L ⁻¹ 10,00 µL EDTA-Lösung 0,1 mol · L ⁻¹ 375,00 µL LiCl-Lösung 2 mol · L ⁻¹ 50,00 µL MgCl ₂ -Lösung 2 mol · L ⁻¹ 1,90 mL Methanol ad 10 mL mit demin. Wasser 70/30 Verdünnen mit MPD
Dialysepuffer I	27,82 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,62 g Natriumdihydrogenphosphat 23,38 g Natriumchlorid 3,08 g DTT ad 4 L mit demin. Wasser Einstellen mit NaOH auf pH 8,0

Dialysepuffer II	47,66 g HEPES 1,60 g Natriumchlorid 3,08 g DTT ad 4 L mit demin. Wasser Einstellen mit NaOH auf pH 7,0
EDTA-Lösung 0.1 mol · L ⁻¹	1,49 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ad 40 mL mit demin. Wasser Einstellen mit NaOH auf ungefähr pH 7,0; Test mit Indikatorpapier
EDTA-Lösung 0.5 mol · L ⁻¹	16,81 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ad 100 mL mit demin. Wasser
HEPES-Puffer 500 mmol · L ⁻¹	11,92 g HEPES ad 100 mL mit demin. Wasser Einstellen mit NaOH auf pH 7,0
IEX-Puffer A	11,92 g HEPES 1,46 g Natriumchlorid 0,77 g DTT ad 1 L mit demin. Wasser Einstellen mit NaOH auf pH 7,0 Steril filtrieren
IEX-Puffer B	5,96 g HEPES 14,61 g Natriumchlorid 0,39 g DTT ad 500 mL mit demin. Wasser Einstellen mit NaOH auf pH 7,0 Steril filtrieren
IPTG-Lösung	3,60 g IPTG ad 15 mL mit demin. Wasser
LB-Medium	10,00 g Natriumchlorid 10,00 g Trypton/Pepton aus Casein 5,00 g Hefeextrakt ad 1 L mit demin. Wasser Autoklavieren vor Verwendung
LC-Puffer	10,00 mL MBT-Puffer 0,10 mL DTT-Lösung 1 mol · L ⁻¹ 0,10 mL EDTA-Lösung 0,1 mol · L ⁻¹ 3,75 mL LiCl-Lösung 2 mol · L ⁻¹ ad 100 mL mit demin. Wasser

LC-Puffer 55/10	10,00 mL MBT-Puffer 0,10 mL DTT-Lösung 1 mol · L ⁻¹ 0,10 mL EDTA-Lösung 0,1 mol · L ⁻¹ 2,75 mL LiCl-Lösung 2 mol · L ⁻¹ 0,50 mL MgCl ₂ -Lösung 2 mol · L ⁻¹ ad 100 mL mit demin. Wasser
LC-Puffer 75/10	10,00 mL MBT-Puffer 0,10 mL DTT-Lösung 1 mol · L ⁻¹ 0,10 mL EDTA-Lösung 0,1 mol · L ⁻¹ 3,75 mL LiCl-Lösung 2 mol · L ⁻¹ 0,50 mL MgCl ₂ -Lösung 2 mol · L ⁻¹ ad 100 mL mit demin. Wasser
Lithiumchlorid-Lösung 2 mol · L ⁻¹	3,39 g Lithiumchlorid ad 40 mL mit demin. Wasser
Magnesiumchlorid-Lösung 100 mmol · L ⁻¹	0,38 g Magnesiumchlorid ad 40 mL mit demin. Wasser
Magnesiumchlorid-Lösung 2 mol · L ⁻¹	7,62 g Magnesiumchlorid ad 40 mL mit demin. Wasser
Mastermix Kristallisation LC mit Ligand	71,53 µL Protein in LC-Puffer 1,99 µL MBT-Puffer 1,99 µL Mega 8 Lösung 10 mmol · L ⁻¹ 5,96 µL Peptid in LC-Puffer 10 mmol · L ⁻¹ Nicht peptidischer Ligand als Feststoff
Mastermix Kristallisation LC ohne Ligand	71,53 µL Protein in LC-Puffer 1,99 µL MBT-Puffer 1,99 µL Mega 8 Lösung 10 mmol · L ⁻¹ 5,96 µL Peptid in LC-Puffer 10 mmol · L ⁻¹
Mastermix Kristallisation LC 55/10 mit Ligand	71,53 µL Protein in LC 55/10-Puffer 1,99 µL MBT-Puffer 1,99 µL Mega 8 Lösung 10 mmol · L ⁻¹ 5,96 µL Peptid in LC-Puffer 10 mmol · L ⁻¹ Nicht peptidischer Ligand als Feststoff
Mastermix Kristallisation LC 75/10 mit Ligand	71,53 µL Protein in LC 75/10-Puffer 1,99 µL MBT-Puffer 1,99 µL Mega 8 Lösung 10 mmol · L ⁻¹ 5,96 µL Peptid in LC-Puffer 10 mmol · L ⁻¹ Nicht peptidischer Ligand als Feststoff

MBT-Puffer	10,00 mL MES-Puffer 1 mol · L ⁻¹ Einstellen mit Bis-Tris-Puffer 1 mol · L ⁻¹ auf pH 6,9
Mega 8 Lösung 10 mmol · L ⁻¹	0,32 g Mega8 ad 100 mL mit demin. Wasser
MES-Puffer 1 mol · L ⁻¹	19,52 g MES ad 100 mL mit demin. Wasser
Natriumchlorid-Lösung 2 mol · L ⁻¹	116,90 g Natriumchlorid ad 1 L mit demin. Wasser Steril filtrieren
Natriumchlorid-Lösung 4 mol · L ⁻¹	233,80 g Natriumchlorid ad 1 L mit demin. Wasser
Natriumhydroxid-Lösung 1 mol · L ⁻¹	40,00 g Natriumhydroxid ad 1 L mit demin. Wasser Steril filtrieren
Puffer A	6,96 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,16 g Natriumdihydrogenphosphat 29,22 g Natriumchlorid 0,68 g Imidazol ad 1 L mit demin. Wasser Einstellen mit NaOH auf pH 8,0
Puffer A2	6,96 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,16 g Natriumdihydrogenphosphat 29,22 g Natriumchlorid ad 1 L mit demin. Wasser Einstellen mit NaOH auf pH 8,0
Puffer B	6,96 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,16 g Natriumdihydrogenphosphat 29,22 g Natriumchlorid 36,04 g Imidazol ad 1 L mit demin. Wasser Einstellen mit NaOH auf pH 8,0
SDS-Laufpuffer	100,00 mL Rotiphorese 10× SDS-PAGE ad 1 L mit demin. Wasser
SDS-Lösung 10 %	4,00 g SDS 36,00 mL demin. Wasser

SDS-Probenpuffer	2,00 mL Tris-Lösung 1 mol · L ⁻¹ 1,00 mL Glycerol 5,00 mL SDS-Lösung 10 % 0,15 g DTT 0,15 mL Bromphenolblau gesättigt in EtOH 1,85 mL demin. Wasser
Tris-Lösung 1 mol · L ⁻¹	15,76 g Tris Hydrochlorid ad 100 mL mit demin. Wasser Einstellen mit NaOH auf pH 6,8
ZYM5025-Medium	800 µL 1000× Trace Metal Stock 17,80 g Dinatriumhydrogenphosphat 13,61 g Kaliumdihydrogenphosphat 10,70 g Ammoniumchlorid 6,44 g Natriumsulfat Decahydrat 1,10 g Magnesiumsulfat Hydrat 40,00 g Trypton/Pepton aus Casein 20,00 g Hefe-Extrakt 20,00 mL Glycerol 8,00 g Lactose 2,00 g Glucose ad 4 L mit demin. Wasser Autoklavieren vor Verwendung

Verwendete Lösungen der Liganden zur Vermessung in Assays und zur Kristallisation wurden je nach Molekulargewicht des Liganden auf einer Feinwaage der Firma Sartorius in Eppendorf-Cups abgewogen und anschließend durch Zugabe der verwendeten Puffer gelöst. Zur Optimierung des *Thermal-Shift*-Assays wurden Liganden in Wasser gelöst, in der späteren Vermessungsphase wurden die Liganden in Assay-Puffer für TSA gelöst. Bei Verwendung im Thermophoreseassay wurden die Liganden in Assay-Puffer für MST gelöst. Zur Kristallisation wurden peptidische Liganden in LC-Puffer gelöst und Fasudil-Derivate, Fragmente und Adenosinphosphate direkt im Eppendorf-Cup für die Kristallisations-Stammlösung („*Master-Mix*“) eingewogen.

1.4 Verwendete Software

Tabelle 14: Verwendete Software in alphabetischer Reihenfolge.

Name	Verwendung
Antechamber ^{[39][40]}	Berechnung der Geometrien von simulierten Peptidstrukturen
Coot ^[41]	Modellbau der Kristallstrukturen
cpptraj ^[42]	Ermittlung der mittleren quadratischen Fluktuation in Simulationen
gaussian09 ^[43]	Berechnung von Partialladungen von simulierten Peptidstrukturen
Microsoft Excel	Auswertung der <i>Thermal-Shift</i> -Ergebnisse
mmpbsa.py ^[44]	MMGBSA-Berechnungen, Berechnung der Interaktionsenergien von simulierten Strukturen
MOE ^[45]	Gerüst-Austausch der Peptidstrukturen
Mosflm ^[46]	Berechnung der Datensammlungsstrategie
NTAnalysis	Auswertung der Thermophorese-Ergebnisse
parmchk ^[47]	Berechnung fehlender Kraftfeld-Parameter
Phaser ^[48]	Durchführung von Molekularem Ersatz
Phenix ^[49]	Verfeinerung der Kristallstrukturen
Pymol ^[50]	Betrachtung der Kristallstrukturen im .pdb-Format
pmemd.cuda ^{[51] [52] [53]}	Durchführung der Molekulardynamik-Simulationen
RESP ^[54]	Berechnung von Partialladungen der Adamantyl-Aminosäuren
tLEaP ^[47]	Erzeugung von Parameter-Dateien, Solvation des Proteins und Ladungsausgleich in Simulationsbox
XDS ^[55]	Prozessierung der Kristall-Datensätze
xLEaP ^[47]	Erzeugung von Adamantylaminosäure-Strukturen

2. Methoden

2.1 SDS-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung auf Reinheit wurden Proteinlösungen über SDS-Gelelektrophorese analysiert. Mit dieser Methode werden Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Dabei wurde eine 20 μ L Probe der zu untersuchenden Lösung zuerst mit 20 μ L des SDS-Probenpuffers versetzt. Die resultierende Lösung wurde bei 95 °C und 300 rpm für 5 min in einem Thermomixer comfort der Firma Eppendorf erhitzt, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren. Gleichzeitig wurde ein für die SDS-Gelelektrophorese geeignetes Gel in einer Gelelektrophoresekammer der Marke Mini-V8 von BioRad, die mit SDS-Laufpuffer gefüllt war, gegeben. Der Kamm wurde entfernt und 20 μ L der denaturierten Proteinlösung in eine Geltasche pipettiert. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurde ein Molekulargewichtsstandard der Firma Thermo Scientific in eine leere Tasche gegeben. Nach Befüllen der Gelkammer wurde eine Spannung von 120 V für 1-2 h angelegt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel entnommen und über Nacht auf einem Polymax 1040 Schüttelinkubator der Firma Heidolph in einer Rotiblu-Färbelösung inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Gel mit Wasser gewaschen und die Banden analysiert. Der verwendete Molekulargewichtsstandard ist in Abbildung 81 zu sehen.

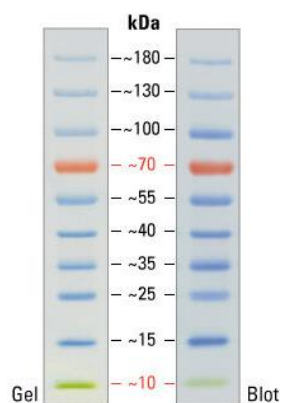


Abbildung 81: Banden im verwendeten Molekulargewichtsstandard.

2.2 Sterilisation

Die verwendeten Zellmedien ZYM5025^[56] und LB^[57] wurde in einem Autoklav vom Typ FVA/2 der Firma Fedegari für 20 Minuten bei 121 °C und einem Überdruck von 1 bar sterilisiert. Puffer wurden mittels eines aufschraubbaren Sterilfilters für Schott-Flaschen („*bottle-top filter*“) mit Porengröße 0,2 µm der Firma Thermo Scientific sterilfiltriert. Proteinlösungen für Kristallisationsansätze und ITC-Messungen wurde mittels eines Eppendorf-Cup Sterilfilters Ultrafree MC und Zentrifugation in einer Minizentrifuge der Marke Ika sterilfiltriert.

2.3 Rekombinante Produktion der cAMP abhängigen Proteinkinase A aus chinesischen Hamster-Ovarien (CHO PKA)^[58]

2.3.1 Transformation von Zellen und Herstellung von Glycerol-Stocks

Die für die rekombinante Produktion der Proteinkinase A benötigten Bakterien wurden durch Transformation von kompetenten Zellen mit einem geeigneten Plasmid erhalten. Dabei wurde ein bereits vorhandenes Plasmid von Dr. B. WIENEN-SCHMIDT^[35] verwendet.

Zur Transformation wurde eine 50 µL Probe kompetenter *E.coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen der Firma Novagen mit 100 ng des Plasmids, das in Wasser gelöst vorlag, versetzt und für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in einem Thermomixer comfort der Firma Eppendorf für 30 s auf 42 °C erhitzt und danach sofort auf Eis gelagert. Nach 10 min bei 4 °C wurde mit LB-Medium auf 1 mL aufgefüllt und die Kultur in einem Schüttelinkubator Innova 4230 der Firma New Brunswick für 45 min bei 37 °C und 70 rpm inkubiert. Die Bakterienkultur wurde in einer Tischzentrifuge der Firma Roth bei 13000 rpm pelettiert und 900 µL des Überstandes verworfen.

Der Rest der Lösung wurde mittels Pipettieren resuspendiert und unter einer Sterilbank auf einer Agarplatte, die die Antibiotika Chloramphenicol und Ampicillin enthielt, ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C in einem Brutschrank der Firma Labnet inkubiert und am nächsten Tag weiterverwendet. Da nur Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, eine Resistenz gegen beide in den Agarplatten enthaltene Antibiotika besitzen, befinden sich auf den Agarplatten nur noch Kolonien Plasmid-haltiger Bakterien.

Zur Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden Glycerol-Stocks aus Übernachtskulturen der gewünschten Bakterien angesetzt. Hierzu wurden 200 mL LB-Medium hergestellt, autoklaviert und nach Abkühlen auf Raumtemperatur unter einer Sterilbank mit 200 µL Ampicillin-Lösung und 200 µL Chloramphenicol-Lösung versetzt.

Anschließend wurde eine Probe der gewünschten Bakterienstämme von den Agarplatten entnommen und in das LB-Medium gegeben. Das Medium wurde mittels einer Aluminiumfolie verschlossen und über Nacht bei 37 °C und 70 rpm in einem Schüttelinkubator Innova 4230 der Firma New Brunswick inkubiert. Am folgenden Tag wurden unter einer Sterilbank 750 µL der Kultur in ein Vial für Glycerol-Stocks, das 250 µL autoklaviertes Glycerol enthielt, gegeben, das Vial verschlossen und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde der Glycerol-Stock bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.2 Wachstum der Zellen mit Übernachtskultur

Zu Beginn der Arbeit wurde zur Proteingewinnung eine Übernachtskultur verwendet. Dabei wurden 200 mL LB-Medium in einem 500 mL Erlenmeyerkolben angesetzt, autoklaviert und auf Raumtemperatur abgekühlt. In einer Sterilbank wurde das Medium mit 200 µL Ampicillin-Lösung und 200 µL Chloramphenicol-Lösung versetzt. Anschließend wurde die Lösung mit einer Probe eines Bakterien-Glycerol-Stocks versetzt, der Kolben mittels einer Aluminiumfolie abgedeckt und über Nacht bei 37 °C und 70 rpm in einem Schüttelinkubator Innova 4230 der Firma New Brunswick inkubiert. 2 L ZYM5025-Medium wurden in 5 L Erlenmeyerkolben angesetzt (6 Kolben, gesamt 12 L Medium), autoklaviert und abgekühlt. Am folgenden Tag wurden jeweils 2 L ZYM5025-Medium in einer Sterilbank mit 2 mL Ampicillin-Lösung, 2 mL Chloramphenicol-Lösung und 20 mL der Übernachtskultur versetzt. Die Kolben wurden mittels einer Aluminiumfolie abgedeckt und in einem Schüttelinkubator Innova 43 der Firma New Brunswick für 9 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert.

Anschließend wurde die Temperatur auf 20 °C reduziert, jeweils 2 L des Mediums mit 2 mL IPTG-Lösung versetzt und weitere 58 h inkubiert. Die Kulturen wurden mit 1 mL AntiFoam A pro 2 L Medium versetzt und die Zellen durch Zentrifugation in einer Avanti J-25-Zentrifuge der Firma Beckmann bei 9000 rpm für 10 min geerntet. Das so erhaltene Zellpellet wurde in 50 mL Falcon-Röhrchen überführt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Bakterienpellets erfolgte bei -80 °C.

2.3.3 Wachstum der Zellen ohne Übernachtskultur

Im späteren Verlauf der Arbeit wurde auf die Übernachtskultur verzichtet. 2 L ZYM5025-Medium wurden in einem 5 L Erlenmeyerkolben angesetzt (6 Kolben, gesamt 12 L Medium), autoklaviert und abgekühlt.

Jeweils 2 L ZYM5025-Medium wurden in einer Sterilbank mit 2 mL Ampicillin-Lösung, 2 mL Chloramphenicol-Lösung und einer Pipettenspitze des Glycerol-Stocks versetzt. Die Kolben wurden mittels einer Aluminiumfolie abgedeckt und in einem Schüttelinkubator Innova 43 der Firma New Brunswick für 9 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur auf 20 °C reduziert und 34 Stunden weiter inkubiert. Jeweils 2 L des Mediums wurden mit 2 mL IPTG-Lösung versetzt und erneut 24 h inkubiert. Die Kulturen wurden mit 1 mL AntiFoam A pro 2 L Medium versetzt und die Zellen durch Zentrifugation in einer Avanti J-25-Zentrifuge der Firma Beckmann bei 9000 rpm für 10 min geerntet. Das so erhaltene Zellpellet wurde in 50 mL Falcon-Röhrchen überführt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Bakterienpellets erfolgte bei -80 °C.

2.3.4 Aufschluss der Zellen

Zum Aufschluss der Zellen wurden die bei -80 °C gelagerten Bakterienpellets in einen Plastik-Mörser („Fantaschale“) überführt, auf Eis gestellt und mit Aufschluss-Mix übergossen. Während das Bakterienpellet langsam auftaute, wurde es mit einem Spatel und einem Pistill verrührt und gerieben, bis das gesamte Pellet in der Lösung resuspendiert war. Die so erhaltene grobe Suspension wurde mithilfe eines Glas-*Douncers* homogenisiert bis eine einheitliche, dünnflüssige Lösung vorlag. Diese Lösung wurde in einem Ultraschall Branson Sonifier 250 der Marke Heinemann aufgeschlossen, indem bei einer Eintauchtiefe der Sonifier-Spitzer von etwa 1 cm 5 Minuten bei 30 % *Duty Cycle* und *Output Control 3* gepulst wurde. Dieser Zyklus wurde unter Kühlung auf Eis durchgeführt und insgesamt dreimal Mal wiederholt.

Im späteren Verlauf der Arbeit wurde ein Emulsiflex C3 der Firma Avestin verwendet. Dieser wurde zuerst mit Aufschluss-Mix äquilibriert. Im Anschluss wurde die Bakterien-Suspension 3 Mal bei einem Gegendruck von 15000-20000 psi durch den Emulsiflex gepumpt. Auch hierbei wurden die Lösung und die Schläuche des Emulsiflex auf Eis gekühlt.

Bei der Verwendung des Emulsiflex wurde im Aufschluss-Mix auf die optionale Zugabe von Lysozym verzichtet, da dies zu einer zähflüssigen Lösung führte, die den Emulsiflex auf Dauer schädigen würde.

Die durch den Aufschluss mit Sonifier oder Emulsiflex erhaltenen Suspensionen wurden in einer Avanti J-25 Zentrifuge der Firma Beckman Coulter 2 h bei 20000 rpm zentrifugiert. Die pelletierten Zellbestandteile wurden verworfen und das Lysat zur weiteren Aufreinigung verwendet.

2.3.5 Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Das durch den Aufschluss erhaltene Zelllysate wurde mittels eines Spritzenfilters der Firma Roth filtriert und unter Kühlung auf Eis über eine mit Puffer A äquilibrierte His-Trap HP Nickelsäule der Firma GE Healthcare gepumpt. Hierzu wurde eine Peristaltikpumpe P-1 der Firma Pharmacia Biotech mit einer Flussrate von $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ benutzt. Da das gewünschte Protein mit einem Hexahistidin-Affinitätsmarker versehen ist, ist es in der Lage Nickel zu komplexieren. Die verwendete His-Trap-Säule weist auf dem Säulenmaterial immobilisierte Nickel-Ionen auf. Diese Nickel-Ionen sind nun in der Lage, das gewünschte Protein durch Komplexbildung auf der Säule zu binden. Nicht-bindende Zellbestandteile, die in der Lösung vorliegen, können die Säule passieren und liegen im Durchfluss vor. Nach Durchlaufen der Säule befanden sich nur noch das gewünschte Protein und unspezifisch bindende Zellbestandteile auf der Säule, während der größte Teil der unerwünschten Verunreinigungen über den Durchfluss abgetrennt und entsorgt wurde. Nach Passieren des gesamten Zelllysats wurde die His-Trap-Säule mit Puffer A gespült und anschließend an eine FPLC-ÄKTAbasic oder FPLC-ÄKTAprime der Firma GE Healthcare angeschlossen. Die Säule, die während der Chromatographie verwendeten Puffer, sowie die Gefäße zur Fraktionssammlung wurden mittels Eis gekühlt. Die His-Trap-Säule wurde mit einer Mischung aus 98 % Puffer A und 2 % Puffer B gespült und die Fluoreszenzabsorption des Durchflusses bei 280 nM gemessen.

Nach Erreichen einer konstanten Fluoreszenz-Grundlinie wurde ein Gradient angelegt, in dem bei einer Flussrate von $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ in 100 min die Konzentration von Puffer B von 2 % auf 100 % gesteigert wurde.

Da das in Puffer B in hoher Konzentration vorliegende Imidazol ebenfalls in der Lage ist von Nickel-Ionen komplexiert zu werden, verdrängt es das Protein von den Bindungsstellen der His-Trap-Säule und sorgt somit für eine Elution der schwach unspezifisch bindenden Verunreinigungen (ungewünschte Proteine u.ä.) und anschließend, bei einer höheren Konzentration von Imidazol, des gewünschten Proteins. Der Durchfluss der Säule wurde in 5 mL Fraktionen gesammelt. Das resultierende Chromatogramm ist in Abbildung 82 gezeigt. Die Fraktionen der Protein-Elution wurden mittels SDS-Gelelektrophorese auf ihre Zusammensetzung untersucht. Das erhaltene SDS-Gel ist in Abbildung 82 gezeigt

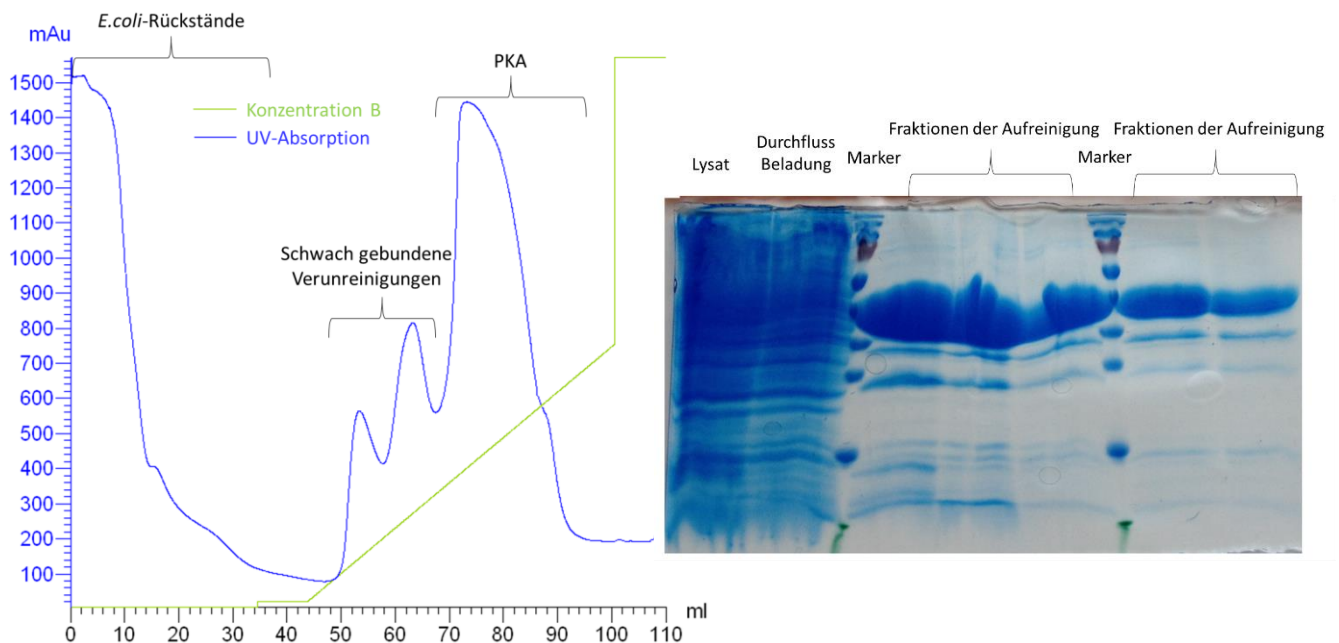


Abbildung 82 Chromatogramm und SDS-Gel der Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie.

Die Überladung des Gels zeigt die große Menge des enthaltenen Proteins. Einige unspezifisch bindende Verunreinigungen sind noch in den Fraktionen enthalten. Alle Fraktionen, die das gewünschte Protein enthalten, wurden vereinigt und weiterverwendet.

2.3.6 Entfernung des Hexahistidin-Affinitätsmarkers

Das bei der ersten Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie erhaltene Roh-Protein enthält einen N-terminalen Hexahistidin-Affinitätsmarker (His₆-Affinitätsmarker). Da die Proteinkinase A jedoch im nativen Zustand verwendet werden soll, muss dieser His₆-Affinitätsmarker entfernt werden.

Hierzu wurden die erhaltenen vereinigten Proteinfractionen mit 14 mL einer *TEV*-Proteasen-Lösung ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) versetzt und in einen ZelluTrans Dialyseschlauch mit MWCO 12,000-14,000 der Firma Roth gegeben.

Die rekombinant produzierte PKA besitzt in direkter Nachbarschaft zum His₆-Affinitätsmarker eine Schnittstelle für diese Protease und ermöglicht somit eine Abspaltung des Affinitätsmarkers in Lösung bei Zugabe der *TEV*-Protease.

Der Dialyseschlauch wurde in 4 L des Dialysepuffers I überführt und unter Rühren 72 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Dialyseschlauch aus dem Puffer entfernt, die Lösung aus dem Dialyseschlauch entnommen und weiterverwendet.

2.3.7 Aufreinigung mittels inverser Affinitätschromatographie

Die aus der Dialyse erhaltene Lösung ist eine Mischung aus der gewünschten Proteinkinase A und der *TEV*-Protease sowie geringer Mengen an unspezifischen Verunreinigungen. Eine weitere Aufreinigung ist vonnöten. Da die *TEV*-Protease einen eigenen His₆-Affinitätsmarker besitzt, der im Verlauf der vorangegangenen Dialyse nicht abgespalten wird kann die Protease an der His-Trap-Säule gebunden werden. Unspezifisch bindende Verunreinigungen binden ebenfalls an der His-Trap-Säule während die PKA aufgrund der Entfernung des His₆-Markers keine nennenswerte Bindung an Nickel-Ionen aufweist und somit eine Auftrennung mittels inverser Affinitätschromatographie ermöglicht. Hierzu wurde die Lösung aus der Dialyse unter Kühlung auf Eis über eine His-Trap HP-Säule der Firma GE Healthcare gepumpt. Dabei wurde die Peristaltikpumpe P-1 der Firma Pharmacia Biotech verwendet und die HisTrap-Säule an eine FPLC-ÄKTAbasic der Firma GE Healthcare angeschlossen, um die Fluoreszenzabsorption des Durchflusses zu messen. Die Flussgeschwindigkeit betrug $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Vor Anschluss der His-Trap-Säule wurde die Fluoreszenz-Grundlinie der FPLC-Äkta auf die Absorption des Puffers A „genullt“. Nach vollständiger Auftragung der Proteinlösung wurde die His-Trap bis zum Erreichen der Fluoreszenz-Grundlinie mit Puffer A gespült. Der Durchfluss wurde bis zu diesem Punkt vollständig in einer Fraktion aufgefangen und auf Eis gekühlt. Er enthält die vom His₆-Affinitätsmarker befreite PKA. Die His-Trap wurde mit 100 % Puffer B gespült, um die *TEV*-Protease von der Säule zu eluieren. Der hierbei erhaltene Durchfluss wurde getrennt gesammelt und entsorgt. Der PKA-haltige Durchfluss wurde mittels SDS-Gelelektrophorese auf seine Zusammensetzung untersucht.

Das Chromatogramm der Aufreinigung und das entsprechende SDS-Gel sind in Abbildung 83 gezeigt.

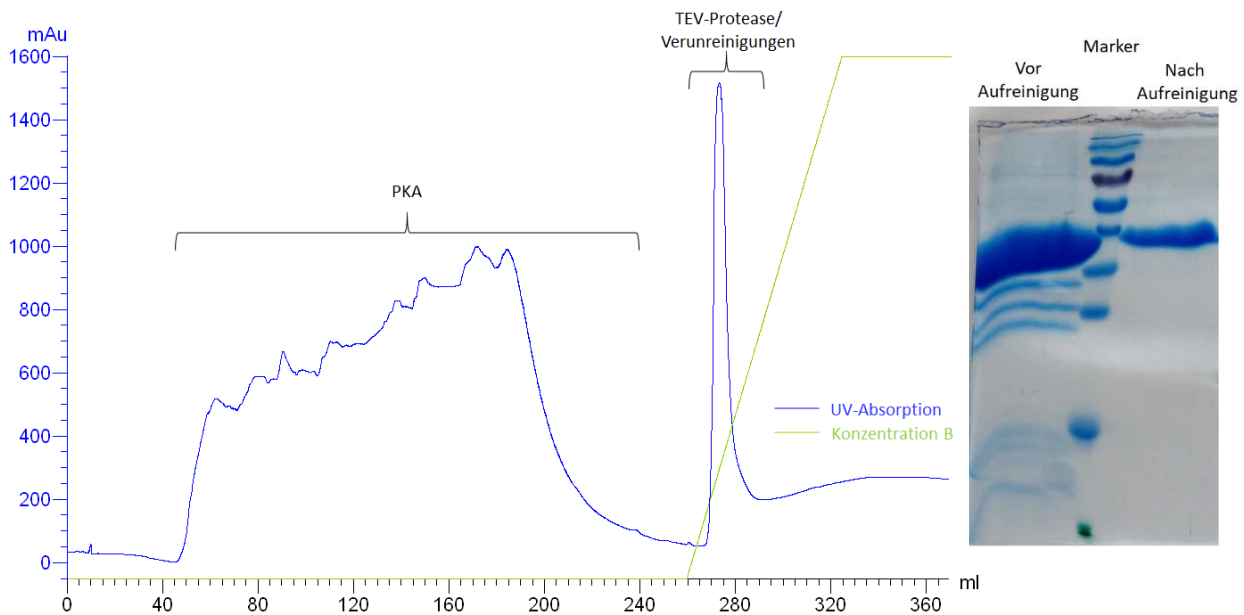


Abbildung 83 Chromatogramm und SDS-Gel der Aufreinigung mittels inverser Affinitätschromatographie.

Die PKA-haltige Lösung wurde in einen ZelluTrans Dialyseschlauch mit MWCO 12,000-14,000 der Firma Roth gegeben. Der Dialyseschlauch wurde in 4 L des Dialysepuffers II überführt und unter Rühren über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung aus dem Dialyseschlauch entnommen und weiterverwendet.

2.3.8 Aufreinigung mittels Kationenaustauschchromatographie

Die bei der inversen Affinitätschromatographie erhaltene Proteinkinase A weist nur noch geringe Verunreinigungen auf. Jedoch liegt sie bereits in den Bakterienzellen in mehreren unterschiedlichen Phosphorylierungsstufen vor. Zur besseren Kristallisation und besseren Reproduzierbarkeit der Assays mussten diese Phosphorylierungsstufen voneinander getrennt werden. Hierzu wurde eine Kationenaustauschchromatographie mithilfe einer MonoS der Firma GE Healthcare durchgeführt. Hierbei wird das Protein entsprechend seiner Ladung an das Säulenmaterial gebunden. Eine höhere negative Ladung des Proteins, resultierend aus einem höheren Grad an Phosphorylierung, sorgt für eine schwächere Bindung an die MonoS. Durch Elution mit einer hohen Konzentration an Natriumchlorid wird das negativ geladene Protein durch Natrium-Ionen von der Säule verdrängt. Dabei werden für mehrfach phosphorylierte Moleküle niedrigere Konzentrationen an Natriumchlorid benötigt.

Zur Auftrennung wurde die Proteinlösung, die sich nach der inversen Affinitätschromatographie erhalten ließ, an einer FPLC-ÄKTAbasic der Firma GE Healthcare unter Kühlung auf 4 °C mittels eines Superloop 50 mL der Firma GE Healthcare auf die mit IEX-Puffer A äquilibrierte MonoS aufgetragen. Die Flussrate betrug $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Vor der Auftragung wurde die Grundlinie der Fluoreszenzabsorption auf IEX-Puffer A „genullt“. Nach vollständiger Auftragung der Lösung wurde die MonoS mit IEX-Puffer A gespült bis eine konstante Fluoreszenzabsorption vorlag. Anschließend wurde ein Gradient angelegt, bei dem im Verlauf von 100 min die Konzentration von IEX-Puffer B von 0 % auf 40 % erhöht wurde. Der Durchfluss wurde in 5 mL Fraktionen gesammelt und auf Eis gekühlt. Die Fraktionen der einzelnen Fluoreszenzspitzen wurden getrennt voneinander gesammelt und auf ihre Zusammensetzung durch SDS-Gelelektrophorese untersucht. Das Chromatogramm und das entsprechende SDS-Gel sind in Abbildung 84 gezeigt.

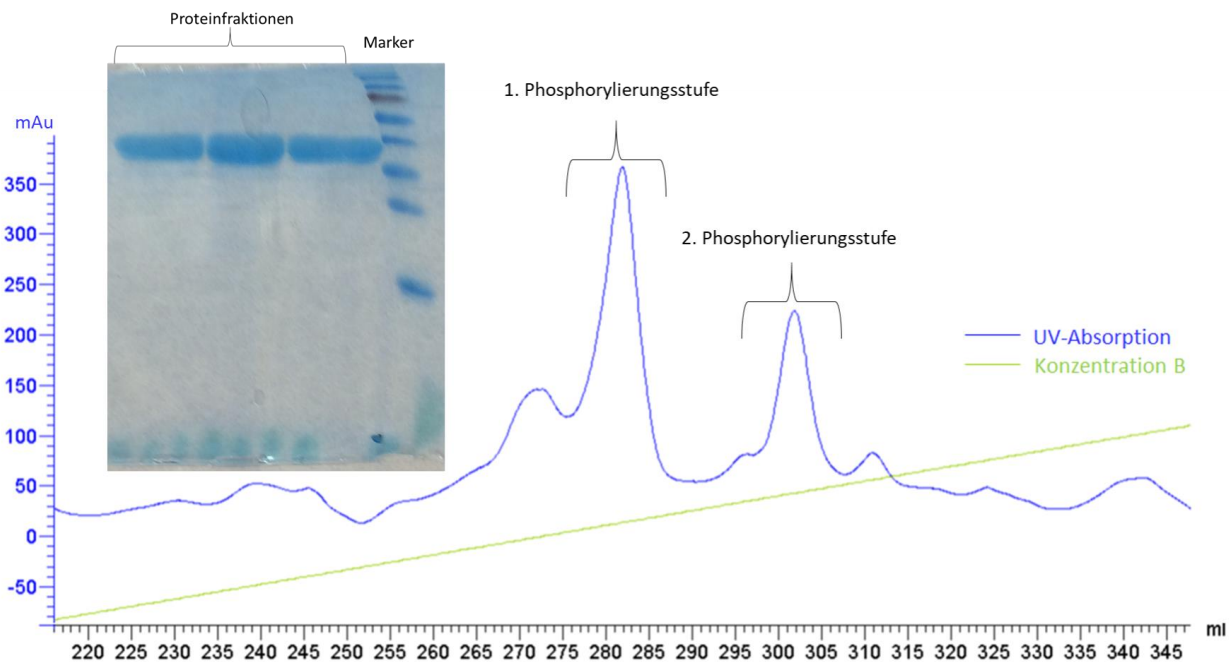


Abbildung 84 Chromatogramm und SDS-Gel der Kationenaustauschchromatographie.

Die jeweiligen Fraktionen der einzelnen Phosphorylierungsstufen wurden vereinigt und die Proteinkonzentration jeweils mittels eines NanoDrop 2000 Spectrophotometer der Firma Thermo Scientific bestimmt. Anschließend wurden die Lösungen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.4 Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde ein NanoDrop 2000 Spectrophotometer der Firma Thermo Scientific verwendet. Gemessen wurde die Absorption der Proteinlösung bei 280 nm. Hierbei wurde zuerst eine Hintergrundmessung durchgeführt, indem der Puffer, in dem das Protein vorlag, im Gerät vermessen und als Leerwert tariert wurde. Die Absorption bei 280 nm ließ sich mithilfe des Lambert-Beerschen-Gesetz^[59] direkt in eine Konzentration umrechnen.

$$E_{280\text{ nm}} = \varepsilon_{280\text{ nm}} \cdot c \cdot d$$

$E_{280\text{ nm}}$ bezeichnet hierbei die Extinktion, d.h. die Menge des von der Lösung absorbierten Lichtes einer Wellenlänge von 280 nm, $\varepsilon_{280\text{ nm}}$ bezeichnet den spezifischen Extinktionskoeffizienten der zu untersuchenden Substanz bei 280 nm, c deren Konzentration und d die Schichtdicke der durchstrahlten Lösung. Der spezifische Extinktionskoeffizient der PKA beträgt $53860\text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ während das Molekulargewicht 40,6 kDa umfasst. Die Schichtdicke d ist in der Nanodrop-Software voreingestellt. Die Berechnung erfolgte direkt mithilfe dieser Software.

Zur Bestimmung der Konzentrationen von fluoreszenzmarkierten Proteinen wurde in der Nanodrop-Software zusätzlich zum Protein der Farbstoff AlexaFluor647 ausgewählt und vermessen, dessen spezifischer Extinktionskoeffizient im Programm abgespeichert ist.

2.5 Mikroskalierter Thermophorese-Assay (MST)

Zur Vermessung im Mikroskalierten Thermophorese-Assay (MST) musste das Protein zuerst mit einer fluorogenen Gruppe markiert werden. Hierzu wurde das von Nanotemper Technologies erhältliche *Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS (Amine Reactive)* verwendet. Dieses knüpft eine fluorogene Gruppe kovalent an ein Lösungsmittel-zugängliches Lysin des Proteins.

Die Fluoreszenzmarkierung wurde entsprechend der Anleitung des *Kits* durchgeführt. Die gesamte Probenvorbereitung wurde bei 18 °C durchgeführt.

Die im *Kit* vorliegende Pufferaustauschsäule wurde invertiert, bis das Säulenmaterial vollständig homogenisiert war. Der Puffer zur Lagerung der Säule wurde durch Zentrifugation bei 1500 ×g für 1 min entfernt. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule mit 300 µL des im *Kit* enthaltenen *Labeling*-Puffers versetzt und erneut für 1 min bei 1500 ×g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt drei Mal wiederholt, um die Säule vollständig mit dem *Labeling*-Puffer zu äquilibrieren. Nach erfolgter Äquilibration wurden 100 µL der Proteinlösung auf die Säule aufgetragen und für 2 min bei 1500 ×g zentrifugiert. Dabei wurden Proteinlösungen der ersten in der Kationenaustauschchromatographie erhaltenen Phosphorylierungsstufe verwendet. Die Konzentrationen der verwendeten Lösungen betrugen zwischen 16 µmol · L⁻¹ und 18 µmol · L⁻¹.

Nach der Umpufferung wurde die Konzentration der Proteinlösung erneut bestimmt. Der im *Kit* enthaltene Farbstoff wurde zuerst mit 30 µL DMSO gelöst und anschließend durch Zugabe des *Labeling*-Puffers auf die drei- bis vierfache Konzentration der Proteinlösung eingestellt. 100 µL der Proteinlösung wurden mit 100 µL des Farbstoffes vermischt und diese Mischung 30 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Gleichzeitig wurde die im *Kit* enthaltene Aufreinigungssäule geöffnet, der enthaltene Überstand verworfen und die Säule zur Äquilibration mit 3 mL des Assay-Puffers versetzt. Nach Passage des Puffers durch die Säule wurde der Durchfluss verworfen und dieser Schritt zweimal wiederholt. Anschließend wurde die gesamte Mischung aus Farbstoff und Proteinlösung auf die Säule aufgetragen. Nach Einsinken der Mischung in das Säulenmaterial wurden 300 µL Assay-Puffer hinzugegeben und erneut bis zum Einsinken der Lösung gewartet. Danach wurden 600 µL Assay-Puffer auf die Säule gegeben und alle Fraktionen des Durchflusses, die eine bläuliche Färbung aufwiesen, aufgefangen. Die Konzentration des Proteins und des Farbstoffes wurde an einem NanoDrop 2000 Spectrophotometer der Firma Thermo Scientific bestimmt und anhand des Verhältnisses beider Konzentrationen die Markierungseffizienz bestimmt.

$$\text{Markierungseffizienz} = \frac{c_{\text{Farbstoff}}}{c_{\text{Protein}}}$$

Idealerweise beträgt das Verhältnis von Farbstoff zu Protein genau 1. Dies würde bedeuten, dass jedes Proteinmolekül im Durchschnitt mit genau einer fluorogenen Gruppe markiert wurde.

Ein Verhältnis über 1 würde bedeuten, dass mehrere fluorogene Gruppen angefügt wurden, während ein Verhältnis unter 1 zeigt, dass nicht jedes Proteinmolekül markiert wurde.

Nach der erfolgten Fluoreszenzmarkierung wurde die korrekte Konzentration zur Messung im Gerät bestimmt. Hierfür wurde die Proteinlösung in eine Kapillare gefüllt und entsprechend Abbildung 85 im Schlitten des Monolith NT.115 platziert.



Abbildung 85: Befüllung des Schlittens mit Kapillaren und Platzierung im Monolith NT.115.

Anschließend wurde ein Kapillar-Scan durchgeführt. Hierbei wurde die Fluoreszenz innerhalb der Kapillare gemessen. Wichtig ist die Stärke der Fluoreszenz, die im Bereich zwischen 300 und 1000 Fluoreszenz-Counts liegen sollte, sowie die Form des erhaltenen Diagramms (siehe Abbildung 86). In der Optimierungsphase wurden Standard-Kapillaren sowie solche mit hydrophober bzw. hydrophiler Beschichtung getestet.

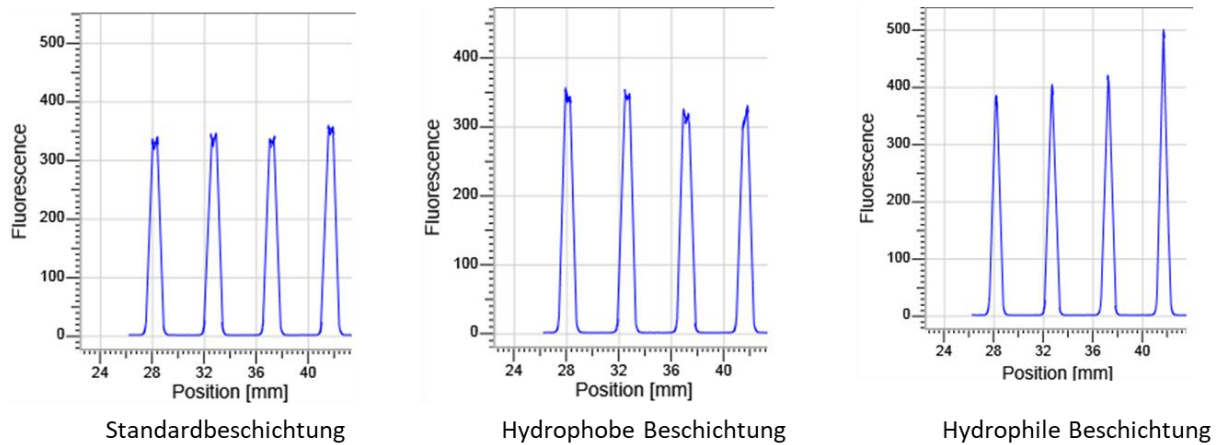


Abbildung 86: Kapillarscan unter Verwendung unterschiedlich beschichteter Kapillaren.

Ein Vorliegen von Doppelspitzen im Diagramm zeigt Adhäsionseffekte des Proteins an den Kapillarwänden. Dies beeinflusst die Thermophorese und verhindert aussagekräftige Messungen. Nach der Optimierungsphase wurden nur noch hydrophil-beschichtete Kapillaren und deren Nachfolgemodell Premium-beschichtete Kapillaren verwendet.

Bei der Bestimmung der Bindungsaffinität der Liganden zur PKA wurden jeweils drei Verdünnungsreihen mit 16 verschiedenen Proben durchgeführt. Das Reaktionsvolumen jeder Probe betrug 40 μL . Die Affinitätsbestimmung von Peptiden wurde sowohl mit, als auch ohne Zugabe von ATP durchgeführt. Die Affinitätsbestimmung von Fasudil-Derivaten, sowie Adenosinphosphaten wurden analog zu Peptidmessungen ohne ATP durchgeführt. Die Durchführung der Verdünnungsreihe ist in Abbildung 87 gezeigt.

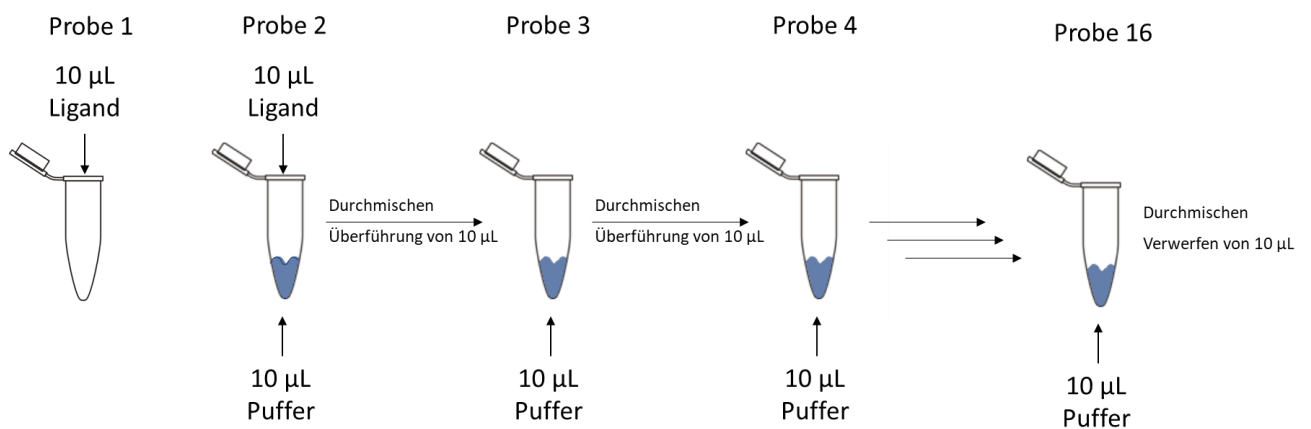


Abbildung 87: Durchführung der Verdünnungsreihe.

Material und Methoden

Nach Durchführung der Verdünnungsreihe wurde jede der nun 10 μL enthaltenen Proben nach den folgenden Pipettierschemata aufgefüllt.

Tabelle 15: Pipettierschema der Messreihen mit und ohne ATP.

Pipettierreihe	Puffer / μL	Protein / μL	ATP-Stammlösung / μL	Gesamtvolumen / μL
Ohne ATP	20	10	-	40
Mit ATP	10	10	10	40

Während der Optimierungsphase wurden die Messungen analog pipettiert; die Pufferzusammensetzung und die Konzentration der Stammlösungen wurde jedoch variiert. Zu Beginn wurden die Messungen im Assay-Puffer O1 durchgeführt, der eine deutlich höhere Natriumchlorid-Konzentration im Gegensatz zum finalen Assay-Puffer aufwies und kein Magnesiumchlorid enthielt. Ebenfalls wurde bei den ersten Versuchen kein Tween 20 hinzugegeben.

Die hierbei resultierenden Kurven zeigten jedoch extrem starke Adhäsionseffekte des Proteins (siehe Abbildung 88)

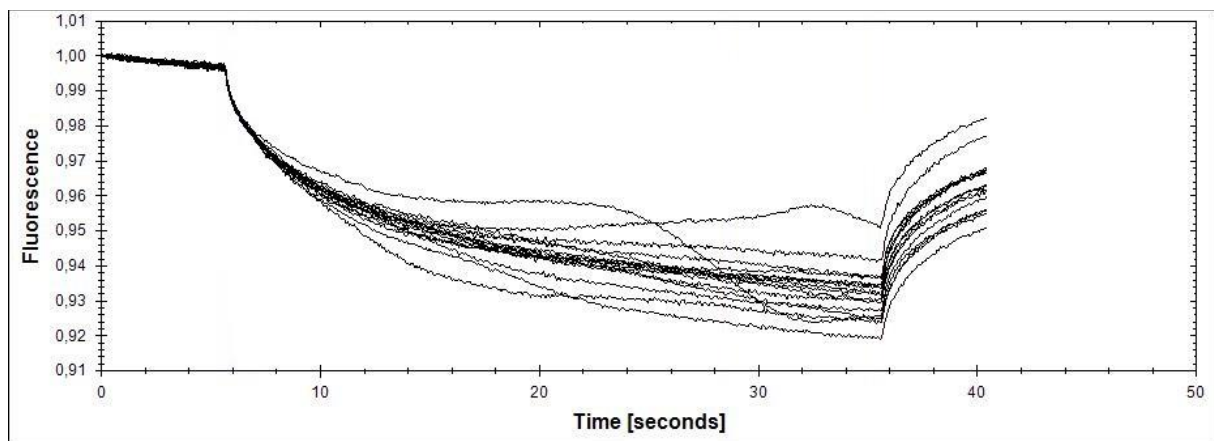


Abbildung 88: Thermophoresekurve ohne Tween 20.

Alle darauffolgenden Messungen der Optimierungsphase wurden in Assay-Puffer O2 durchgeführt, der Tween 20 enthielt. Die Stammlösungen der Peptide betrugen in der Optimierungsphase $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, als Stammlösung für ATP wurde jedoch eine $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Lösung des Magnesiumsalzes verwendet. Bei diesen Messungen konnte keinerlei Affinität der Liganden detektiert werden.

Nach der Optimierungsphase wurde nur noch im Assay-Puffer vermessen, der sowohl Tween 20, als auch Magnesiumchlorid und eine geringere Konzentration an Natriumchlorid enthielt. Ebenfalls wurde eine $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Stammlösung des Natrium-ATP-Salzes verwendet. Die Konzentration der Liganden-Stammlösung betrug $0,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Vor der Vermessung wurden sämtliche Proben für eine Minute in einer Tischzentrifuge der Marke Roth zentrifugiert. Unter diesen Bedingungen konnten befriedigende Bindungskurven erhalten werden. Ein Beispiel für solche Kurven ist in Abbildung 89 gezeigt.

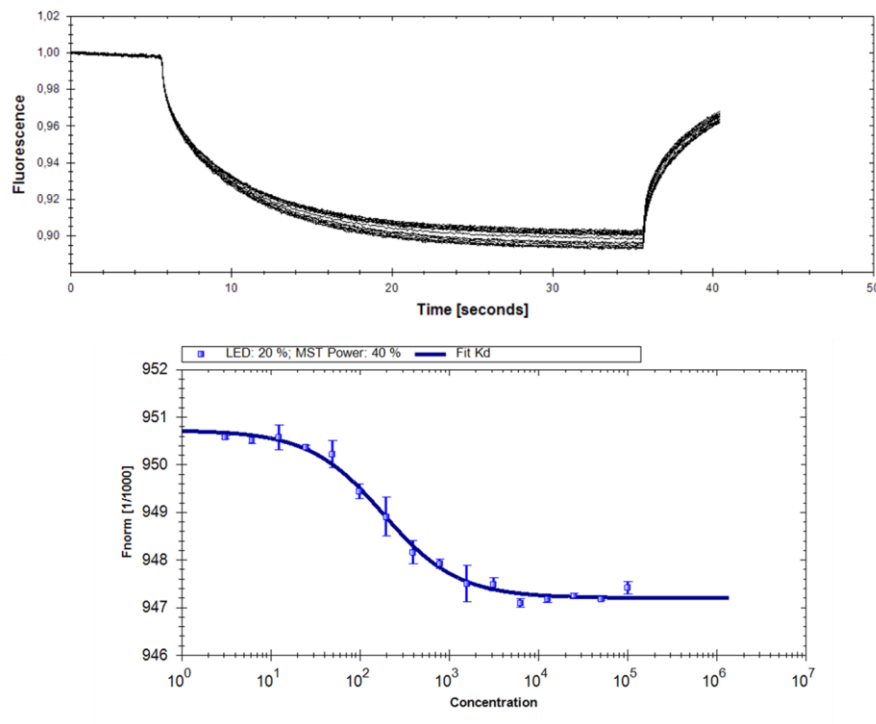


Abbildung 89: Thermophoresekurve unter optimierten Bedingungen (oben) und Bindungskurve (unten).

Die Auswertung der Bindungskurven erfolgte über das Programm *NTAnalysis* der Firma Nanotemper Technologies. Dabei wurde entweder die Methode des Temperatur-Sprungs, der Thermophorese oder eine Kombination beider Methoden zur Bestimmung der Bindungskurve verwendet. Die Konzentration des Fluorophors wurde hierbei festgesetzt und die Trendlinie der Bindungskurve automatisch durch das Programm anhand der vorliegenden Datenpunkte berechnet.

2.6 Thermal-Shift-Assay (TSA)

Zur Ermittlung von geeigneten Pufferbedingungen und als *Pre-Screening*-Assay wurde der Thermal-Shift-Assay (TSA) eingesetzt. Dieser wurde an einem IQ5-Cycler der Marke Bio-Rad durchgeführt.



Abbildung 90: Verwendeter IQ5-Cycler von Bio-Rad.

Während der Optimierungsphase wurden verschiedene Bedingungen getestet und somit mit unterschiedlichen Stammlösungen gearbeitet. Verwendet wurden eine $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES-Lösung (pH 7,0), eine $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Natriumchlorid-Lösung, eine $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Magnesiumchlorid-Lösung, eine $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP-Natriumsalz-Lösung und eine $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP-Natriumsalz-Lösung verwendet. Die Stammlösungen wurden in unterschiedlichen Mengen gemischt und mit demin. Wasser auf ein Reaktionsvolumen von $150 \mu\text{L}$ aufgefüllt um die Konzentration der Pufferbestandteile zu variieren. In den Tabelle 15-18 sind das Volumen der Stammlösungen, das zur Einstellung bestimmter Konzentrationen benötigt wurde, und die getesteten Bedingungen aufgezeigt.

Tabelle 16: Benutzte Volumina der 100 mmol/L Magnesiumchlorid-Lösung und mit ihr getestete Konzentrationen.

Konzentration [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]	0,80	1,60	5,00	10,00	15,00	20,00	25,00
Volumen [μL]	1,20	2,40	7,50	15,00	22,50	30,00	37,50

Tabelle 17: Benutzte Volumina der 100 mmol/L ATP-Natriumsalz-Lösung und mit ihr getestete Konzentrationen.

Konzentration [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]	10,00	20,00	30,00	40,00	50,00	60,00
Volumen [μL]	1,20	2,40	7,50	15,00	22,50	30,00

Tabelle 18: Benutzte Volumina der 50 mmol/L ATP-Natriumsalz-Lösung und mit ihr getestete Konzentrationen.

Konzentration [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]	1,25	2,50	3,75	5,00	6,25	7,50	8,75
Volumen [μL]	3,75	7,50	11,25	15,00	18,75	22,50	26,25

Tabelle 19: Benutzte Volumina der 4 mol/L Natriumchlorid-Lösung und mit ihr getestete Konzentrationen.

Konzentration [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]	500
Volumen [μL]	37,50

Für jede einzelne vermessene Probe wurde ein Reaktionsvolumen von 150 μL vorbereitet und mit 0,3 μL 5000 \times SYPRO-Orange der Firma Life Technologies versetzt. Jeweils 39 μL der Probe wurden in ein *Well* einer 96-Well-PCR-Platte der Firma Bio-Rad gegeben und mit 1 μL einer 4-7 mg/mL PKA-Lösung versetzt. Für jede Reaktionsbedingung wurde eine Dreifachmessung durchgeführt. Die Proben wurden mit einer geeigneten Folie der Firma Bio-Rad verschlossen und in den IQ5-Cycler gegeben. Bei der Ermittlung der Schmelzkurve wurde bei einer Temperatur von 10 $^{\circ}\text{C}$ begonnen und das Protein bis auf 70 $^{\circ}\text{C}$ aufgeheizt. Der Aufheizvorgang wurde in 120 Zyklen durchgeführt, bei dem in jedem Zyklus die Temperatur um 0,5 $^{\circ}\text{C}$ erhöht und für eine Minute gehalten wurde.

Nach Ermittlung der korrekten Reaktionsbedingungen wurden sämtliche Messungen im Assay-Puffer für TSA gemessen. Die Stammlösungen der Liganden und ATP wurden ebenfalls mit Assay-Puffer aufgefüllt, so dass keine Konzentrationsschwankungen auftraten. In Tabelle 19 sind die Konzentrationen der verwendeten Stammlösungen aufgezeigt

Tabelle 20: Konzentrationen der verwendeten Stammlösungen.

Stammlösung	Konzentration
ATP-Natriumsalz	50 mmol · L ⁻¹
ADP-Natriumsalz	50 mmol · L ⁻¹
AMP-Natriumsalz	50 mmol · L ⁻¹
Peptidische Liganden	1 mmol · L ⁻¹
Fasudil-Derivat-Liganden	1 mmol · L ⁻¹

Im Thermal-Shift Assay konnten grundsätzlich drei verschiedene Messreihen unterschieden werden: Die Vermessung von Liganden ohne ATP, die Vermessung von Liganden mit ATP und die Vermessung von Adenosinphosphaten. Peptidische Liganden wurden sowohl mit, als auch ohne Zugabe von ATP vermessen. Die Pipettierschemata sind in den folgenden Tabellen zu finden.

Tabelle 21: Pipettierschema für Ligandenmessungen ohne ATP.

Probennummer	1	2	3	4	5	6	7
Puffer [μL]	150,00	149,30	149,10	148,50	147,00	142,50	135,00
Ligand [μL]	0,00	0,30	0,90	1,50	3,00	7,50	15,00
Sypro-Orange [μL]	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30

Tabelle 22: Pipettierschema für Ligandenmessungen mit ATP.

Probennummer	1	2	3	4	5	6	7
Puffer [μL]	135,00	134,50	134,10	133,50	132,00	127,50	115,00
Ligand [μL]	0,00	0,30	0,90	1,50	3,00	7,50	15,00
Na ₂ ATP [μL]	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Sypro-Orange [μL]	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30

Tabelle 23: Pipettierschema für Adenosinphosphat-Messungen.

Probennummer	1	2	3	4	5	6	7	8
Puffer [μL]	150,00	146,25	142,50	138,75	135,00	131,25	127,50	123,75
Ligand [μL]	0,00	3,75	7,50	11,25	15,00	18,75	22,50	26,25
Sypro-Orange [μL]	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30

Auch nach der Optimierungsphase wurden jeweils 39 μL der Proben in ein *Well* einer 96-*Well*-PCR-Platte gegeben, mit 1 μL einer 4-7 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ PKA-Lösung versetzt. Jede Reaktionsbedingung wurde dreifach pipettiert und bestimmt. Die Proben wurden mit einer geeigneten Folie der Firma Bio-Rad verschlossen und im IQ5-Cycler platziert. Die Ermittlung der Schmelzkurve verlief analog zur Durchführung während der Optimierungsphase. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe von Microsoft Excel. Dabei wurde der Wendepunkt der Auftragung von Fluoreszenz gegen die Temperatur bestimmt, indem das Minimum der ersten Ableitung ermittelt wurde.

2.7 (Co-)Kristallisation der PKA

Zur Aufklärung der Strukturen wurde das Protein im Komplex mit den jeweiligen Liganden kristallisiert. Dabei wurde das Dampfdiffusionsverfahren verwendet. Grundsätzlich konnte die Kristallisation in LC-Puffer und die Kristallisation in LC 55/10-Puffer unterschieden werden. Der Unterschied hierbei war nur der verwendete Puffer, sämtliche weiteren Schritte wurden analog durchgeführt.

Zuerst wurde ein Pufferaustausch einer aufgereinigten Proteinprobe durchgeführt, indem mittels Vivaspins mit MWCO 30,000 der Firma Sartorius und Zentrifugieren in einer Multifuge 3 Zentrifuge der Marke Heraeus bei 3500 rpm und 4 °C die Lösung auf 1 mL eingengt und mit LC-Puffer auf 15 mL aufgefüllt wurde. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal wiederholt. Nach dem erfolgten Pufferaustausch wurde die Proteinlösung auf 5-10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ aufkonzentriert und mittels eines Ultrafree MC Sterilfilters der Firma Merck Millipore filtriert. Anschließend wurde die Kristallisationslösung (*Master-Mix*) vorbereitet. Ein Pipettierschema für den *Master-Mix* ist in den folgenden Tabellen zu finden.

Tabelle 24 Pipettierschema für *Master-Mix*

Lösung	Volumen [μL]
Protein	71,53
MBT-Puffer	1,99
10 mmol \cdot L ⁻¹ Mega 8	1,99
10 mmol \cdot L ⁻¹ Peptid-Ligand	5,96

Wurden neben den peptidischen Liganden weitere Inhibitoren oder Fragmente im Komplex mit der PKA kristallisiert, so wurden diese als Feststoffe an einer Feinwaage der Firma Sartorius abgewogen und im Eppendorf-Cup für den *Master-Mix* vorgelegt. Dabei wurden die Einwaagen je nach Molekulargewicht angepasst, so dass folgende Endkonzentrationen erreicht wurden:

Tabelle 25: Gewünschte Konzentrationen für Liganden und Fragmente.

Ligand	Konzentration [mmol \cdot L ⁻¹]
Fasudil-Derivate	5
Adenosinphosphate	2 bzw. 5
4-Bromphenylboronsäure	25
Adamantylamin	25 bzw. 100

Abschließend wurde jeder *Master-Mix* 15 min bei 12000 rpm und 4 °C in einer Tischzentrifuge von Roth zentrifugiert.

Zu Beginn der Arbeit wurden EasyXtal 15 Well Tools *Hanging-Drop* Kristallplatten der Firma Qiagen verwendet, jedoch wurde sehr schnell auf *Sitting-Drop*-Platten der Firma Hampton Research gewechselt. Die *Wells* der *Sitting-Drop* Platten wurden vor Benutzung mit einer sehr dünnen Schicht „Korasilon“ mittelviskos der Firma Kurt Obermeier GmbH bestrichen, um dem Anhaften von Kristallen am Plattenmaterial vorzubeugen.

Wurde mit „Fluorinert“ gearbeitet, so wurde kein „Korasilon“ verwendet, sondern jedes *Well* mit 5 μL „Fluorinert“ befüllt.^[60]

Sämtliche Kristallisationsansätze wurden bei 4 °C pipettiert und gelagert. Dazu wurden die Reservoir-Lösungen der Kristallplatten mit 400 µL der Methanol/Wasser-Mischungen befüllt. Dabei wurden Mischungen zwischen 14 und 23 % v/v verwendet. Anschließend wurden 3 µL Tropfen des *Master-Mix* auf jeden Deckel der *Hanging-Drop*-Platten bzw. in jedes *Well* der *Sitting-Drop*-Platten pipettiert und die *Wells* verschlossen. Zum Verschließen der *Sitting-Drop*-Platten wurde hierbei *Shark-Tape*[®] der Firma Hampton Research verwendet. Die Platten wurden bis zur Bildung von Kristallen bei 4 °C gelagert.

Kristalle der PKA ohne peptidische Liganden wurden von C. SIEFKER übernommen und weiterverwendet.

2.8 „Soaking“

Das Einlegen von Kristallen in Lösungen mit weiteren Liganden, auch „Soaking“ genannt, ist eine gute Methode um mit hoher Durchsatzrate die Möglichkeit der Bindung von Liganden an Proteine zu untersuchen.^{[61][62]}

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kristalle der PKA, die keinerlei Liganden enthielten, von C. SIEFKER übernommen und für das Soaking verwendet. Dazu wurden Cryoschutz-Lösungen (siehe Abschnitt 2.18. Einfrieren der Proteinkristalle) vorbereitet, die zusätzlich den gewünschten Liganden mit einer Konzentration von 10 mmol · L⁻¹ enthielten. Ein 3 µL Tropfen dieser Lösung wurde in einem leeren *Well* einer *Sitting-Drop*-Platte platziert und ein Kristall in diesen Tropfen überführt. Das *Well* wurde mittels *Shark-Tape*[®] verschlossen und der Kristall für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Kristall in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Diese Methode war nur bei Fasudil-Derivaten erfolgreich; beim „Soaking“ von Adenosinphosphaten und peptidischen Liganden wurde der Kristall selbst bei geringeren Ligandenkonzentrationen oder vorherigem Quervernetzen (siehe 2.17 Quervernetzung von Kristallen mittels Glutaraldehyd) nach Sekunden zerstört.

Weiterhin wurden Kristalle des Peptids PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²², das eine sehr schlechte Affinität aber gute Kristallisationseigenschaften aufwies, in *Wells* der Kristallplatten von PKI(RBS¹⁹)⁵⁻²², PKI(S-SC1⁷)⁵⁻²², PKI(BB1¹⁵⁻¹⁷)⁵⁻²², PKI(S-SC2¹¹)⁵⁻²² überführt und bis zum Auftreten von Rissbildung (etwa 20 min) inkubiert. Anschließend wurden die Kristalle eingefroren.

Ebenfalls wurden Kristalle des Peptids PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² analog zu den Liganden-freien Kristallen mit Yttriumchlorid und Lanthanchlorid versetzt, jedoch wurde die Konzentration der Schwermetall-Ionen auf 2 mmol · L⁻¹ reduziert und die Zeit auf 2 h erhöht.^{[63][64]}

2.9 „Seeding“

Zur Einführung von Kristallisationskeimen in die Ansätze, um die Bildung von Kristallen mit besserer Qualität zu erleichtern, wurden Kristalle niedriger Qualität mittels eines Pferdehaares zerdrückt und somit zu Splittern zerkleinert. Das Pferdehaar wurde gewaschen, indem es einmal durch einen 3 µL Tropfen LC-Puffer gezogen wurde, um die Menge der Kristallsplitter zu reduzieren. Die anschließend noch am Pferdehaar haftenden Kristallsplitter wurden durch einmaliges Hindurchziehen des Haares durch die gewünschten Kristallisationslösungen in den Kristallisierplatten überführt.^{[65][66]} Für die Optimierung der Kristallisation mit Adamantyl-Peptiden und PKI(RBS¹⁹)⁵⁻²², die die Kristallisation behinderten, wurde am MarXtal ein *Microseeding-Screen* durchgeführt.^{[67][68]}

Vorzugsweise wurden hierbei Kristalle gewählt, die aus den selben Bedingungen stammten, die im *Well* herrschten, das angeimpft werden sollte. Für Bedingungen, bei denen keinerlei Kristalle vorhanden waren, wurden Kristalle des Peptids PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² verwendet.

2.10 Quervernetzung von Kristallen mittels Glutardialdehyd

Einige Kristalle wiesen eine hohe Zerbrechlichkeit auf, die eine weitere Verwendung unmöglich machten. Zur Stabilisierung dieser Kristalle wurde nach einer Vorschrift von KÖSTER^[38] eine Quervernetzung von auf der Proteinoberfläche vorhandenen Lysinen mittels Glutardialdehyd durchgeführt.^[69] Dazu wurde über dem in einem *Sitting-Drop-Well* befindlichen Kristall ein Deckglas mit einem 5 µL Tropfen einer 25 % Glutardialdehyd-Lösung platziert und mit Silikonfett verschlossen.

Das im Tropfen befindliche Glutardialdehyd kann mittels Dampfdiffusion in den Tropfen gelangen und somit die Kristalle an ihrer Oberfläche Quervernetzen.^[70] Nach einer Stunde wurde das Deckglas entfernt und der Kristall weiterverwendet.

2.11 Einfrieren der Proteinkristalle

Zur Strukturaufklärung mittels Röntgenbeugung mussten die Kristalle zuerst in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Nur so konnte gewährleistet werden, dass die Kristalle bei der Vermessung nicht im Verlauf der Sammlung eines vollständigen Datensatzes durch Strahlenschaden in Mitleidenschaft gezogen wurden.^[71] Das Einfrieren verhindert die Ausbreitung der durch die Röntgenstrahlung entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies und anderer Radikale und erhöht somit die Lebensdauer der Kristalle enorm. Da das Einfrieren die Kristalle jedoch beschädigen kann, muss zuerst ein Cryo-Schutz-Reagenz hinzugegeben werden, das die Integrität des Kristalls bewahrt und die Bildung von kristallinem Wasser erschwert.^{[72][73]}

Die Folie, die die *Wells* der Kristallplatten abdeckte, wurde mithilfe eines Skalpells aufgeschnitten und die Kristalle unter einem Mikroskop mittels *Cryoloops* der Firma Hampton Research aus der Lösung „gefischt“ und in einen neuen 3 μ L Tropfen der Cryoschutzlösung überführt. Diese Cryoschutz-Lösung besteht zu 70 % aus LC-Puffer, der dieselbe Konzentration an Methanol \pm 1 % enthält, die im *Well* des Kristalls vorliegt und zu 30 % MPD beinhaltet. Der Kristall wurde im Tropfen geschwenkt, bis keine Schlieren mehr erkennbar waren und wurde anschließend mit flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem CryoVial der Firma Molecular Dimensions Limited unter weiterer Stickstoffkühlung aufbewahrt.

2.12 Testen der Proteinkristalle

Die Proteinkristalle wurden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff an einem hauseigenen MAR345 Image Plate Detektor mit $I\mu$ Mikrofokusröhre beziehungsweise einem X8 PROSPECTOR mit $I\mu$ S Mikrofokusröhre APEX II CCD Detektor auf ihre Streufähigkeit getestet. Dabei wurde beim MAR345 eine Expositionszeit von 5 min und beim APEX von 40 s gewählt. Der Drehwinkel der Bilder betrug 0,5 °. Es wurden zwei Bilder im Abstand von 90 ° aufgenommen und die Streufähigkeit des Kristalls beurteilt.

Bei einer Streufähigkeit besser als 3 Å und vernachlässigbarer Mosaizität wurden die Kristalle zu einem Synchrotron zur Aufnahme eines Datensatzes verschickt, während schlecht streuende Kristalle verworfen wurden. In Abbildung 91 und 92 sind die Streubilder von guten und schlechten Kristallen gezeigt.

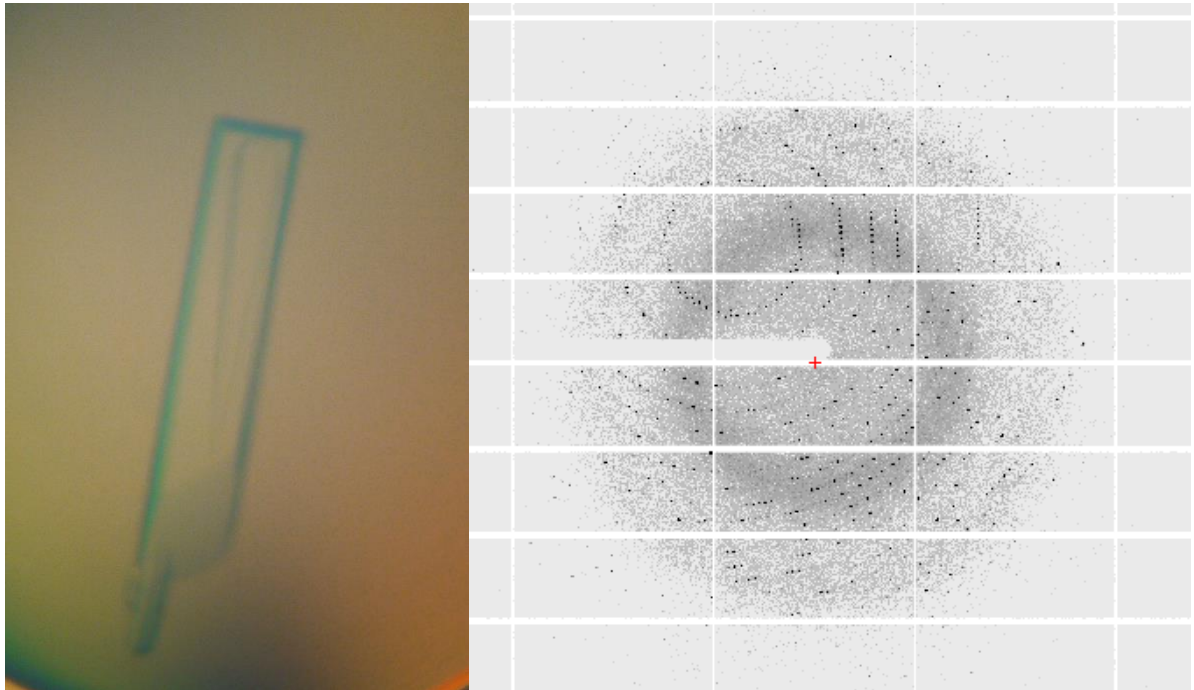


Abbildung 91: Verwendbarer Kristall und gutes Diffraktionsbild.

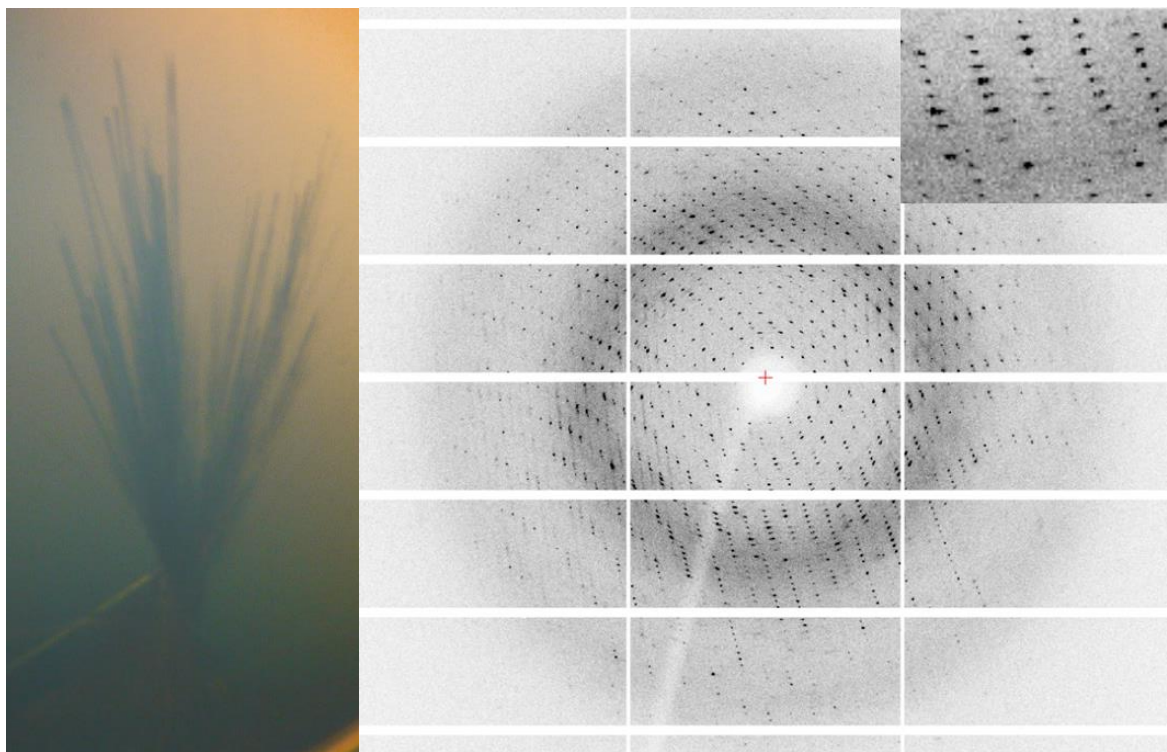


Abbildung 92: Schlechter Kristall und schlechtes Diffraktionsbild. Die Ausschnittsvergrößerung (oben rechts) zeigt die verschmierten Reflexe, die eine hohe Mosaizität anzeigen.

2.13 Datensammlung und Auswertung.

Kristalle, deren Streufähigkeit als ausreichend beurteilt wurde, wurden an einer Synchrotronquelle einer vollständigen Datensammlung unterworfen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Synchrotronquellen waren ESRF in Grenoble (Beamline ID29)^[74], EMBL in Hamburg (Beamline P13)^[75] und BESSY II (Beamline 14.1, 14.2 und 14.3) in Berlin^[76]. Dort wurden Datensätze mit unterschiedlicher Expositionszeit, Drehwinkelbreite und Anzahl an Bildern gesammelt. Die benötigte Anzahl an Bildern und die Drehwinkelbreite wurden mittels zwei Testbildern im Abstand von 90 ° und Berechnung einer Strategie in *Mosflm* bestimmt.^[77]

Die so erhaltenen Datensätze wurden mit dem Programm *Xdsapp* prozessiert. Anschließend wurde ein Molekularer Ersatz mittels einer bekannten Kristallstruktur der PKA durchgeführt.^[78] Das so erhaltene Startmodell wurde in iterativen Zyklen mittels des Programmes *Phenix* verfeinert und die so erhaltenen Modelle mittels *coot* bearbeitet.

2.14 Molekulardynamik-Simulationen

Die zur Erstellung von Strukturvorschlägen für Adamantyl-Peptide benutzten Molekulardynamik-Simulationen wurden von Dr. A. METZ und T. WULSDORF durchgeführt. Hierbei wurden zuerst die Strukturen der neuen Adamantyl-Aminosäuren in *xLEaP* gebaut und anschliessend mit *MOE* ein Gerüst-Austausch durchgeführt („*scaffold-exchange*“). Bei diesem Gerüst-Austausch wurde eine bekannte Struktur der PKA in Komplex mit einem peptidischen Inhibitor als Vorlage verwendet (PDB-Code 3FIQ). Die Adamantyl-Aminosäuren ersetzten hierbei sowohl einzelne als auch, aus sterischen Gründen, mehrere Aminosäuren des nativen peptidischen Inhibitors. Von sämtlichen so erhaltenen Variationen, die geometrisch und von der Orientierung des peptidischen Inhibitors in der Bindetasche möglich waren, wurde eine Bibliothek aufgebaut, mit der weitergearbeitet wurde. Auf diese Art wurden 25 Variationen mit Adamantyl in Seitenketten und 23 Variationen mit Adamantyl im Peptid-Rückgrat erhalten.

Mittels der Programme *gaussian09*, *RESP*, *antechamber* und *parmchk* wurden Kraftfeldterme und Partialladungen für die simulierten Variationen erstellt.

Die Solute wurden anschließend mittels *tLEaP* in einer abgeschnittenen Oktaeder *TIP3P*-Wasserbox solvatisiert. Nach dem Ladungsausgleich mit Hilfe von Natriumchlorid wurden die Parameter-Dateien und Startstrukturen abgespeichert.

Nach Vorbereitung der Simulationsbox wurden Molekulardynamik-Simulationen mit einer Dauer von 500-1000 ns mittels des Programms *pmemd.cuda* durchgeführt.

Die Evaluation der Simulationen wurde mittels der Programme *cpptraj* (V14) und *mmpbsa.py* durchgeführt. Hierbei wurde die mittlere quadratische Fluktuation der Mutanten im Vergleich mit dem nativen Peptid, die mittlere quadratische Fluktuation der im nativen Peptid vorhandenen und für die Affinität essentiellen Arginine an Position 13 und 14 sowie die Interaktionsenergie der Mutanten mit der PKA untersucht. Variationen, deren Fluktuation in der Bindungstasche und Interaktionsenergien ähnlich zum nativen Peptid waren, wurden für die Synthese vorgeschlagen.

VII. Literaturverzeichnis

- 1 G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, *Science*, **2002**, 298, 1912-1933.
- 2 S. S. Taylor, D. R. Knighton, J. Zheng, I. F. Ten Eyck, J. M. Sowadski, *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1992**, 8, 429-462.
- 3 S. Mayer-Wrangowski, D. Rauh, *BIOspektrum*, **2012**, 18, 376-379.
- 4 J. Chatterjee, M. Beullens, R. Sukackaite, J. Qian, B. Lesage, D. J. Hart, M. Bollen, M. Köhn, *Angew. Chemie*, **2012**, 124, 10200-10206.
- 5 P. Cohen, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2002**, 1, 309-315.
- 6 J. Bain, L. Plater, M. Elliott, N. Shpiro, C. J. Hastie, H. Mclauchlan, I. Klevering, J. S. C. Arthur, D. R. Alessi, P. Cohen, *Biochem. J.*, **2007**, 408, 297-315.
- 7 P. J. Hajduk, G. Sheppard, D. G. Nettesheim, E. T. Olejniczak, S.B. Shuker, R. P. Meadows, D. H. Steinman, G. M. Carrera Jr., P. A. Marcotte, J. Severin, K. Walter, H. Smith, E. Gubbins, R. Simmer, T. F. Holzman, D. W. Morgan, S. K. Davidsen, J.B. Summers, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 5818-5827.
- 8 J. W. Liebeschuetz, S. D. Jones P. J. Morgan *et. al*, *J. Med. Chem*, **2002**, 45, 1221-12232.
- 9 C. K. Wada, J. H. Holms, M. L. Curtin *et. al*, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 219-232.
- 10 J. L. Tymoczko, J. M. Berg, L. Stryer, *Biochemistry: A Short Course*, H.W. Freeman and Company, New York, Erste Ausgabe, **2010**, 376.
- 11 S. K. Hanks, T. Hunter, *The FASEB Journal*, **1995**, 9, 576-596.
- 12 G. Manning, G. D. Plowman, T. Hunter, S. Sudarsanam, *TRENDS in Biochemical Sciences*, **2002**, 27, 514-520.
- 13 G. Klebe, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Zweite Auflage **2009**, 434-443.
- 14 L. N. Johnson, M. E. M. Noble, D. J. Owen, *Cell*, **1996**, 85, 149-158.

- 15 D. K. Treiber, N. P. Shah, *Chemistry & Biology*, **2013**, 20, 745-746.
- 16 E. D. Scheeff, J. Eswaran, G. Bunkoczi, S. Knapp, G. Manning, *Structure*, **2009**, 17, 128-138.
- 17 J. F. Kuo, P. Greengard, *Journal of Biological Chemistry*, **1969**, 54, 1349-1355.
- 18 D. Stehelin, H. E. Varmus, J. M. Bishop, *Nature*, **1976**, 260, 170-173.
- 19 R. A. Weiss, *Retrovirology*, **2006**, 3, 3:67.
- 20 L. R. Pearce, D. Komander, D. R. Alessi, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2010**, 11, 9-22.
- 21 H.-C. Cheng, B. E. Kemp, R. B. Pearson, A. J. Smith, L. Misconi, S. M. Van Patten, D. A. Walsh, *The Journal of Biological Chemistry*, **1986**, 261, 989-992.
- 22 J. D. Scott, M. B. Glaccum, E. H. Fischer, E. G. Krebs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, 83, 1613-1616.
- 23 S. Whitehouse, D. A. Walsh, *The Journal of Biological Chemistry*, **1983**, 258, 3682-3692.
- 24 D. A. Walsh, J. P. Perkins, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.*, **1968**, 243, 3763-3765.
- 25 D. R. Knighton, J. H. Zheng, L. F. Ten Eyck, V. A. Ashford, N. H. Xuong, S. S. Taylor, J. M. Sowadski, *Science*, **1991**, 253, 407-414.
- 26 J. M. Canaves, S. S. Taylor, *J. Mol. Evol.*, **2002**, 54, 17-29.
- 27 M.-C. Lo, A. Aulabaugh, G. Jin, R. Cowling, J. Bard, M. Malamas, G. Ellestad, *Analytical Biochemistry*, **2004**, 332, 153-159.
- 28 M. W. Pantoliano, E. C. Petrella, J. D. Kwasnoski, V. S. Lobanov, J. Myslik, E. Graf, T. Carver, E. Asel, B. A. Springer, P. Lane, F. R. Salemme, *Journal of Biomolecular Screening*, **2001**, 6, 429-440.
- 29 P. Baaske, C. J. Wienken, P. Reineck, S. Duhr, D. Braun, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 2238-2241.

- 30 S. Duhr, D. Braun, *PNAS*, **2006**, *103*, 19678-19682.
- 31 L. Wanka, C. Carbele, M. Vanejews, P. R. Schreiner, *Eur. J. Org. Chem*, **2007**, 1474-1490.
- 32 D. Mendel, J. A. Ellman, Z. Chang, D. L. Veenstra, P. A. Kollman, P. G. Schultz, *Science*, **1992**, *256*, 1798-1802.
- 33 L. Liu, N. Xia, Y. Xing, D. Deng, *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, *8*, 11161–11174.
- 34 R. Kirschner, *Dissertation*, **2017**, Universität Marburg.
- 35 B. Wienen-Schmidt, *Dissertation*, **2016**, Universität Marburg.
- 36 R. N. Armstrong, H. Kondo, E. T. Kaiser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1979**, *76*, 722-725.
- 37 H. Köster, *Dissertation*, **2012**, Universität Marburg.
- 38 H. Jakubke, H. Jeschkeit, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Verlag Chemie, Weinheim, **1982**, 40.
- 39 J. Wang, W. Wang, P.A. Kollman, D. A. Case, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **2006**, *25*, 247260.
- 40 J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P.A. Kollman, D. A. Case, *Journal of Computational Chemistry*, **2004**, *25*, 1157-1174.
- 41 P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **2010**, *66*, 486-501.
- 42 D. R. Roe, T. E. Cheatham III, *J. Chem. Theory Com.*, **2013**, *9*, 3084–3095.
- 43 M. J. Frisch *et. al*, Gaussian 09, Revision C. 01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2010**.
- 44 B. R. Miller, T. D. McGee, J. M. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke, A. E. Roitberg, *J. Chem. Theory Comput.*, **2012**, *8*, 3314–3321.
- 45 S. Vilar, G. Cozza, S. Moro, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2008**, *8*, 1555-1572.
- 46 T. G. G. Battye, L. Kontogiannis, O. Johnson, H. R. Powell, A. G. W. Leslie, *Acta Cryst.*, **2011**, *67*, 271-281
- 47 D. A. Case *et al.*, Amber 2015, University of California, San Francisco, **2015**.

- 48 A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn; L. C. Storoni, R. J Read, *J. Appl. Crystallogr.*, **2007**, 40, 658-674.
- 49 P. D. Adams *et al.*, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **2010**, 66, 213-221.
- 50 The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.
- 51 S. Le Grand; A. W. Goetz; R. C. Walker, *Comp. Phys. Comm.*, **2013**, 184, 374-380.
- 52 A. W. Goetz; M. J. Williamson; D. Xu; D. Poole; S. Le Grand; R. C. Walker, *J. Chem. Theory Comput.*, **2012**, 8, 1542-1555.
- 53 R. Salomon-Ferrer; A. W. Goetz; D. Poole; S. Le Grand; R. C. Walker, *J. Chem. Theory Comput.*, **2013**, 9, 3878-3888.
- 54 C. I. Bayly, P. Cieplak, W. D. Cornell, P. A. Kollman, *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97, 10269–10280.
- 55 W. Kabsch, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **2010**, 66, 125-132.
- 56 F. W. Studier, *Protein Expression Purif.*, **2005**, 41, 207-234.
- 57 SJ. Sambrook, E. F. Fritschi, T. Maniatis, Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1989**.
- 58 D. Kudlinzki, V. L. Linhard, K. Saxena, S. Sreeramulu, S. Gande, U. Schieborr, M. Dreyer, H. Schwalbe, *Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.*, **2015**, 71, 1088-1093.
- 59 A. Beer, *Annalen der Physik und Chemie*, **1852**, 86, 78-88.
- 60 H. Adachi, K. Takano, M. Morikawa, S. Kanaya, M Yoshimura, Y. Mori, T. Sasaki, *Acta Cryst.*, **2003**, 59, 194-196.
- 61 A. M. Hassell *et al.*, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **2007**, 63, 72-79.
- 62 D. E. Danley, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **2006**, 62, 569-575.
- 63 Z. Dauter, M. Dauter, K. R. Rajashankar, *Biological Crystallography*, **2000**, 56, 232-237.

- 64 T. J. Boggon, L. Shapiro, *Structure*, **2000**, 8, R143-R149.
- 65 E. A. Stura, I. A. Wilson, *Journal of Crystal Growth*, **1991**, 110, 270-282.
- 66 E. A. Stura, I. A. Wilson, *Methods*, **1990**, 1, 38-49.
- 67 G. C. Ireton, B. L. Stoddard, *Acta Cryst.*, **2004**, 60, 601-605.
- 68 A. D'Arcy, F. Villard, M. Marsh, *Acta Cryst.*, **2007**, 63, 550-554.
- 69 I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, K. C. Waldron, *BioTechniques*, **2004**, 37, 790-802.
- 70 C. J. Lusty, *J. Appl. Cryst.*, **1999**, 32, 106-112.
- 71 W. P. Burmeister, *Acta Cryst.*, **2000**, 56, 328-341.
- 72 E. P. Mitchell, E. F. Garman, *J. Appl. Cryst.*, **1994**, 27, 1070-1074.
- 73 J. M. Harp, D. E. Timm, G. J. Bunick, *Acta Cryst.*, **1998**, 54, 622-628.
- 74 D. de Sanctis *et al.*, *J. Synchrotron Rad.*, **2012**, 19, 455-461.
- 75 M. Cianci, G. Bourenkov, G. Pompidor *et al.*, *J. Synchr. Rad.*, 24, 323-332.
- 76 Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie, *Journal of large-scale research facilities*, **2016**, 2, A47.
- 77 Z. Dauter, *Acta Cryst.*, **1999**, 55, 1703-1717.
- 78 A. J. McCoy, *Acta Cryst.*, **2007**, 63, 32-41.
- 79 UniProtKB - P25321
- 80 UniProtKB - P17612

VIII Danksagung

Würde ich versuchen jeder Person, die zu dieser Arbeit beigetragen hat, einzeln zu danken, dann wäre diese Danksagung zu lange oder aber unvollständig. Deshalb möchte ich an dieser Stelle einfach sagen: Danke an jeden der zu dieser Arbeit beigetragen hat!

IX Anhang

Humane PKA:

10	20	30	40	50
MGNAAAAGG	SEQESVKEFL	AKAKEDFLKK	WESPAQNTAH	LDQFERIKTL
60	70	80	90	100
GTGSFGRVML	VKHKETGNHY	AMKILDKQKV	VKLKQIEHTL	NEKRILQAVN
110	120	130	140	150
FPFLVKLEFS	FKDNSNLYMV	MEYVPGGEMF	SHLRRIGRFS	EPHARFYAAQ
160	170	180	190	200
IVLTFEYLHS	LDLIYRDLKP	ENLLIDQQGY	IQVTDFGFAK	RVKGRTWTLC
210	220	230	240	250
GTPEYLAPEI	ILSKGYNKAV	DWWALGVLIY	EMAAGYPPFF	ADQPIQIYEK
260	270	280	290	300
IVSGKVRFPS	HFSSDLKDLL	RNLLQVDLTK	RFGNLKNGVN	DIKNHKWFAT
310	320	330	340	350
TDWIAIYQRK	VEAPFIPKFK	GPGDTSNFDD	YEEEEIRVSI	NEKCGKEFSEF

CHO PKA:

10	20	30	40	50
MGNAAAAGG	SEQESVKEFL	AKAKEEFLKK	WESPSQNTAQ	LDHFDRIKTL
60	70	80	90	100
GTGSFGRVML	VKHKETGNHY	AMKILDKQKV	VKLKQIEHTL	NEKRILQAVN
110	120	130	140	150
FPFLVKLEFS	FKDNSNLYMV	MEYVPGGEMF	SHLRRIGRFS	EPHARFYAAQ
160	170	180	190	200
IVLTFEYLHS	LDLIYRDLKP	ENLLIDQQGY	IQVTDFGFAK	RVKGRTWTLC
210	220	230	240	250
GTPEYLAPEI	ILSKGYNKAV	DWWALGVLIY	EMAAGYPPFF	ADQPIQIYEK
260	270	280	290	300
IVSGKVRFPS	HFSSDLKDLL	RNLLQVDLTK	RFGNLKNGVN	DIKNHKWFAT
310	320	330	340	350
TDWIAIYQRK	VEAPFIPKFK	GPGDTSNFDD	YEEEEIRVSI	NEKCGKEFTEF

CHO PKA mit Rest des abgeschnittenen Affinitätsmarkers:

10	20	30	40	50	-1 GH
MGNAAAAGG	SEQESVKEFL	AKAKEEFLKK	WESPSQNTAQ	LDHFDRIKTL	
60	70	80	90	100	
GTGSFGRVML	VKHKETGNHY	AMKILDKQKV	VKLKQIEHTL	NEKRILQAVN	
110	120	130	140	150	
FPFLVKLEFS	FKDNSNLYMV	MEYVPGGEMF	SHLRRIGRFS	EPHARFYAAQ	
160	170	180	190	200	
IVLTFEYLHS	LDLIYRDLKP	ENLLIDQQGY	IQVTDFGFAK	RVKGRTWTLC	
210	220	230	240	250	
GTPEYLAPEI	ILSKGYNKAV	DWWALGVLIY	EMAAGYPPFF	ADQPIQIYEK	
260	270	280	290	300	
IVSGKVRFPS	HFSSDLKDLL	RNLLQVDLTK	RFGNLKNGVN	DIKNHKWFAT	
310	320	330	340	350	
TDWIAIYQRK	VEAPFIPKFK	GPGDTSNFDD	YEEEEIRVSI	NEKCGKEFTEF	

Abbildung 93: Sequenzen der katalytischen Untereinheit der humanen und der CHO-PKA.^{[79][80]}

PKI⁵⁻²⁴
 Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile-**His-Asp**
Substrat-Variante von PKI⁵⁻²⁴
 Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-**Ser-Ile-His-Asp**

Abbildung 94: Sequenz des inhibitorischen PKI⁵⁻²⁴-Peptides und dessen Substrat-Variante.^[22]

PKI⁵⁻²⁴
 Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile-**His-Asp**
PKI⁵⁻²² (RKp013)
 Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile
PKI(RBS¹³)⁵⁻²² (RKp017)
 Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-**RbS**-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile
PKI(RBS¹⁸)⁵⁻²² (RKp032)
 Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-**RbS**-Arg-Asn-Ala-Ile
PKI(RBS²⁰)⁵⁻²² (RKp120)
 Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-**RbS**-Ala-Ile
PKI(RBT¹⁶)⁵⁻²² (RKp153)
 Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-**RbT**-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile
PKI(RBS¹⁹)⁵⁻²² (RKp177)
 Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-**RbS**-Asn-Ala-Ile
PKI(RBS¹⁷)⁵⁻²² (RKp182)
 Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-**RbS**-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile
PKI(RBS²¹)⁵⁻²² (RKp191)
 Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-**RbS**-Ile
PKI(BAR¹⁸)⁵⁻²² (RKp193)
 Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-**BAR**-Arg-Asn-Ala-Ile
PKI((S)SC1⁶)⁵⁻²² (RKp241)
 Thr-**(S)SC1**-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile

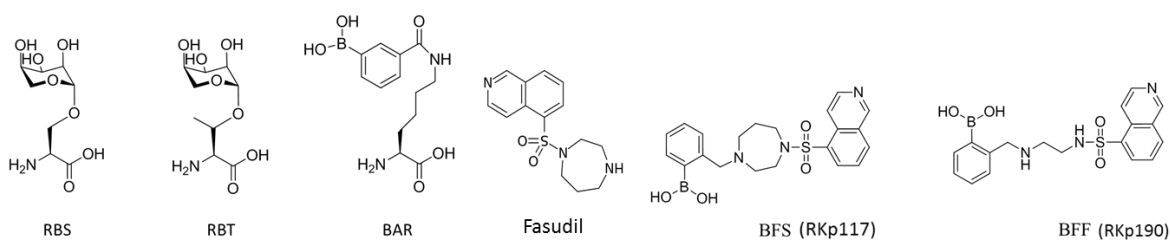


Abbildung 95: Sequenzen der PKI-Analoga sowie der neuartigen Aminosäuren und Fasudil-Derivate. In Klammern sind die internen Benennungen der neuartigen Liganden gezeigt.

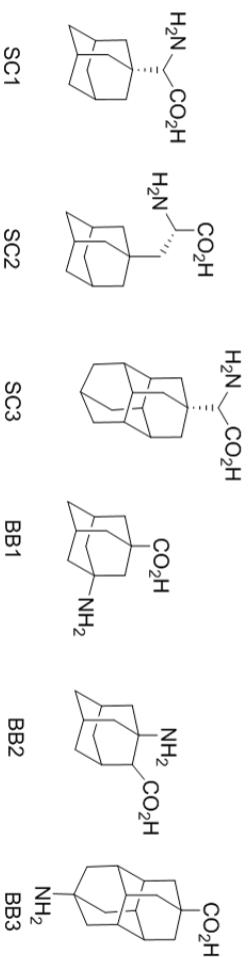
[illegible]

Abbildung 96: Strukturvorschläge für Adamantyl-Peptide aus den MD-Simulationen

Tabelle 26: Liste der erhaltenen Kristallstrukturen

Peptide	Solo	Fasudil	BFS	BFF	AMP	ADP	ATP
-	6EH0	6EM2	-	-	-	-	-
PKI ⁵⁻²²	6ERV	6ERW	5OL3	5OTG	-	-	-
PKI(RBS ¹³) ⁵⁻²²	5OUA	-	6EGW	-	-	-	-
PKI(RBS ¹⁸) ⁵⁻²²	5NTJ	5NW8	n.d.	n.d.	6EH2	6EM6	n.d.
PKI(RBS ²⁰) ⁵⁻²²	6ERU	5O0E	5O5M	6EH3	6ESA	6EM7	6EMA
PKI(RBT ¹⁶) ⁵⁻²²	n.d.	6EMB	6EMC	-	-	-	-
PKI(RBS ¹⁹) ⁵⁻²²	-	-	-	-	-	-	-
PKI(RBS ¹⁶) ⁵⁻²²	-	6ERS	6EMD	6EME	-	-	-
PKI(RBS ²¹) ⁵⁻²²	-	-	5OT3	5OUC	-	-	-
PKI(BAR ¹⁸) ⁵⁻²²	5OUS	-	6ERT	-	n.d.	-	-
PKI((S)-SCI ⁹) ⁵⁻²²	-	5OK3	-	-	-	-	-

Tabelle 27: Liste der internen Benennung der Strukturen

Peptide	Solo	Fasudil	RKp117	RKp190	AMP	ADP	ATP
-	PKA_A	Fasudil_A	-	-	-	-	-
RKp013	RKp013_F	RKp013_Fasudil_C	RKp013_117_D	RKp013_190_D	-	-	-
RKp017	RKp017_C	-	RKp017_117_G	-	-	-	-
RKp032	RKp032_15	RKp032_Fasudil_E	RKp032_117_D	RKp032_190_B	RKp032_ATP_C	RKp032_ATP_C	RKp032_ATP_C
RKp120	RKp120_Q	RKp120_Fasudil_A	RKp120_117_C	RKp120_190_E	RKp120_AMP5_A	RKp120_ADp5_A	RKp120_ATP_B
RKp153	RKp153_D	RKp153_Fasudil_A	RKp153_117_I	-	-	-	-
RKp177	-	-	-	-	-	-	-
RKp182	-	RKp182_Fasudil_A	RKp182_117_B	RKp182_190_A	-	-	-
RKp191	-	-	RKp191_117_A	RKp191_190_A	-	-	-
RKp193	RKp193_E	-	RKp193_117_A	-	RKp193_AMP_B/C	-	-
RKp241	-	RKp241_Fasudil_A	-	-	-	-	-

Tabelle 28: Zusammengefasste Ergebnisse des MST- und *Thermal-Shift*-Assays.

Peptid	K _D aus MST bei 0 mmol · L ⁻¹ ATP	ΔT aus TSA bei 0 mmol · L ⁻¹ ATP, 50 μmol · L ⁻¹ Peptid	K _D aus MST bei 5 mmol · L ⁻¹ ATP	ΔT aus TSA bei 5 mmol · L ⁻¹ ATP, 20 μmol · L ⁻¹ Peptid
PKI ⁵⁻²⁴	Nicht feststellbar	1,17±0,24 °C	144,00±30,00 nmol · L ⁻¹	6,50 ±0,24 °C
PKI ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	0,50±0,29 °C	4,32±0,89 μmol · L ⁻¹	3,50 ±0,00 °C
PKI(RBS ¹³) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	0,17±0,29 °C	2,67±0,35 μmol · L ⁻¹	2,50 ±0,29 °C
PKI(RBS ¹⁸) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	0,00±0,00 °C	Nicht feststellbar	0,17±0,29 °C
PKI(RBS ²⁰) ⁵⁻²²	6,20±5,00 μmol · L ⁻¹	1,00±0,00 °C	29,60±10,00 μmol · L ⁻¹	2,33±0,29 °C
PKI(RBT ¹⁶) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	0,67 ±0,00 °C	26,00±4,65 μmol · L ⁻¹	1,83 ±0,29 °C
PKI(RBS ¹⁹) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	Keine Messung	Nicht feststellbar	Keine Messung
PKI(RBS ¹⁷) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	Keine Messung	93,98±82,59 μmol · L ⁻¹	Keine Messung
PKI(RBS ²¹) ⁵⁻²²	21,86±8,04 μmol · L ⁻¹	Keine Messung	Nicht feststellbar	Keine Messung
PKI(BAR ¹⁸) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	Keine Messung	Nicht feststellbar	Keine Messung
PKI ⁵⁻²⁴	Nicht feststellbar	1,17±0,24 °C	144,00±30,00 nmol · L ⁻¹	6,50 ±0,24 °C
PKI ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	0,50±0,29 °C	4,32±0,89 μmol · L ⁻¹	3,50 ±0,00 °C
PKI((S)-SC1 ⁷) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	Keine Messung	3,14±0,88 μmol · L ⁻¹	Keine Messung
PKI(BB1 ^{15,16}) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	Keine Messung	50,04±8,30 μmol · L ⁻¹	Keine Messung
PKI((S)-SC2 ¹¹) ⁵⁻²²	1,16±0,40 μmol · L ⁻¹	Keine Messung	657,00±143,00 nmol · L ⁻¹	Keine Messung
PKI((S)-SC1 ⁶) ⁵⁻²²	Nicht feststellbar	Keine Messung	Nicht feststellbar	Keine Messung
Fasudil	1,58±1,79 μmol · L ⁻¹	7,83 ±0,00 °C	-	-
BFS	5,86±2,75 μmol · L ⁻¹	3,67 ±0,29 °C	-	-
BFF	7,61±6,25 μmol · L ⁻¹	3,33 ±0,00 °C	-	-
AMP	Nicht feststellbar	-	-	-
ADP	42,21±34,39 μmol · L ⁻¹	-	-	-
ATP	32,94±22,45 μmol · L ⁻¹	-	-	-

Tabelle 29: Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken der deponierten Kristallstrukturen. Tabelle erstreckt sich über mehrere Seiten. Die Werte der höchsten Auflösungsschale sind in Klammern gegeben.

Datensatz	5NTJ	5NW8	5O0E
Wellenlänge in Å	0,918409	0,918400	0,895000
Raumgruppe	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)
Einheitszellkonstanten: a/b/c	59,07/72,66/110,67	69,51/73,11/77,32	58,43/73,03/108,42
Auflösung in Å	1,56	2,09	1,50
Höchste Auflösungsschale in Å	1,65-1,56	2,09-2,21	1,59-1,50
Anzahl einzigartiger Reflexe	67994(10617)	23612(3709)	74729
R _{sym} in %	4,5(49,6)	7,5(37,5)	5,8(49,5)
Vollständigkeit in %	98,8(96,7)	98,0(97,3)	99,1(96,6)
Redundanz	5,51(5,49)	5,19(5,14)	6,12(6,11)
I · σ ⁻¹	19,43(3,14)	16,92(4,95)	18,62(3,62)
Finaler R-Wert für alle Reflexe (R _{work} /R _{free})	14,05/17,66	17,67/21,18	13,06/16,99
Anzahl Wassermoleküle	367	180	370
Ramachandran-Diagramm:			
Bevorzugte Regionen in %	98	98	98
Erlaubte Regionen in %	2	2	2
Verbotene Regionen in %	0	0	0
Durchschnittliche B-Werte in Å ² für:			
Makromolekül	26,57	24,82	20,07
Ligandenatome	Kein Ligand	22,81	15,46
Wassermoleküle	37,33	30,61	31,73
MPD/Cl ⁻	29,90/kein Cl ⁻	38,39/kein Cl ⁻	24,04/kein Cl ⁻
RMSD Bindungslängen in Å	0,010	0,007	0,010
RMSD Bindungswinkel in °	1,04	0,80	1,09

Datensatz	505M	50K3	50L3
Wellenlänge in Å	0,979078	0,885590	0,9184000
Raumgruppe	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)
Einheitszellkonstanten: a, b, c	68,98/72,63/76,83	58,61/73,28/108,43	69,62/73,18/76,91
Auflösung in Å	1,58	1,59	1,58
Höchste Auflösungsschale in Å	1,68-1,58	1,68-1,59	1,68-1,58
Anzahl einzigartiger Reflexe	53352(8345)	63596(9999)	51682(8427)
R _{sym} in %	3,4(49,2)	3,9(50,8)	4,4(48,9)
Vollständigkeit in %	99,5(97,8)	99,7(98,4)	94,7(96,6)
Redundanz	6,45(6,19)	7,34(7,51)	4,68(4,66)
I · σ ⁻¹	26,99(3,53)	26,22(3,14)	22,44(3,07)
Finaler R-Wert für alle Reflexe (R _{work} /R _{free})	14,80/18,24	13,95/17,16	15,34/19,86
Anzahl Wassermoleküle	255	289	340
Ramachandran-Diagramm:			
Bevorzugte Regionen in %	97	98	98
Erlaubte Regionen in %	3	2	2
Verbotene Regionen in %	0	0	0
Durchschnittliche B-Werte in Å ² für:			
Makromolekül	26,72	29,06	19,76
Ligandenatome	31,45	25,13	21,65
Wassermoleküle	37,09	38,93	29,69
MPD/Cl ⁻	Kein MPD/36,95	Kein MPD/kein Cl ⁻	33,56/29,57
RMSD Bindungslängen in Å	0,008	0,008	0,007
RMSD Bindungswinkel in °	0,93	0,95	0,84

Datensatz	5OT3	5OTG	5OUA
Wellenlänge in Å	0,885590	0,918400	0,918400
Raumgruppe	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)
Einheitszellkonstanten: a, b, c	69,21/72,75/76,93	59,16/74,19/109,39	58,64/71,75/110,15
Auflösung in Å	2,04	1,73	1,67
Höchste Auflösungsschale in Å	2,16-2,04	1,83-1,73	1,77-1,67
Anzahl einzigartiger Reflexe	25374(4008)	50582(7917)	54066(8517)
R _{sym} in %	6,0(50,0)	3,7(49,4)	3,8(49,9)
Vollständigkeit in %	99,9(99,6)	98,6(97,0)	98,7(97,8)
Redundanz	7,63(7,80)	4,35(4,32)	5,91(5,94)
I · σ ⁻¹	20,68(3,86)	21,49(2,79)	29,84(3,57)
Finaler R-Wert für alle Reflexe (R _{work} /R _{free})	18,37/22,75	18,61/20,63	16,85/19,39
Anzahl Wassermoleküle	92	174	231
Ramachandran-Diagramm:			
Bevorzugte Regionen in %	98	98	98
Erlaubte Regionen in %	2	2	2
Verbotene Regionen in %	0	0	0
Durchschnittliche B-Werte in Å ² für:			
Makromolekül	36,65	34,31	27,24
Ligandenatome	44,08	33,14	Kein Ligand
Wassermoleküle	38,60	36,42	30,40
MPD/Cl ⁻	56,76/49,49	Kein MPD/kein Cl ⁻	Kein MPD/kein Cl ⁻
RMSD Bindungslängen in Å	0,007	0,007	0,009
RMSD Bindungswinkel in °	0,84	0,79	1,02

Datensatz	5OUC	5OUS	6EGW
Wellenlänge in Å	0,885590	0,918400	0,918400
Raumgruppe	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)
Einheitszellkonstanten: a, b, c	58,59/73,40/108,35	59,15/72,75/110,11	68,54/72,13/76,18
Auflösung in Å	1,46	2,21	1,74
Höchste Auflösungsschale in Å	1,55-1,46	2,34-2,21	1,84-1,74
Anzahl einzigartiger Reflexe	81889	24200	38857
R _{sym} in %	5,7(50,3)	5,0(49,9)	5,3(48,6)
Vollständigkeit in %	99,8(99,3)	98,8(99,1)	97,9(96,0)
Redundanz	7,35(7,18)	4,41(4,44)	5,57(5,66)
I · σ ⁻¹	17,50(2,94)	19,46(3,24)	23,22(3,76)
Finaler R-Wert für alle Reflexe (R _{work} /R _{free})	14,99/17,49	19,38/23,34	17,17/20,26
Anzahl Wassermoleküle	238	81	202
Ramachandran-Diagramm:			
Bevorzugte Regionen in %	98	96	98
Erlaubte Regionen in %	2	4	2
Verbotene Regionen in %	0	0	0
Durchschnittliche B-Werte in Å ² für:			
Makromolekül	29,48	48,85	20,91
Ligandenatome	34,35	Kein Ligand	18,75
Wassermoleküle	37,76	43,43	26,58
MPD/Cl ⁻	Kein MPD/40,00	54,59/kein Cl ⁻	Kein MPD/kein Cl ⁻
RMSD Bindungslängen in Å	0,007	0,007	0,010
RMSD Bindungswinkel in °	0,88	0,81	1,01

Datensatz	6EH0	6EH2	6EH3
Wellenlänge in Å	0,918400	0,918400	0,918400
Raumgruppe	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)
Einheitszellkonstanten: a, b, c	51,69/72,26/97,46	59,02/73,15/109,50	58,68/73,53/108,42
Auflösung in Å	1,49	1,76	1,95
Höchste Auflösungsschale in Å	1,58-1,49	1,87-1,76	2,07-1,95
Anzahl einzigartiger Reflexe	60102	47360	34590
R _{sym} in %	3,8(49,3)	3,5(49,9)	5,4(49,8)
Vollständigkeit in %	98,9(96,6)	99,5(99,0)	98,7(97,1)
Redundanz	4,70(4,46)	5,88(5,84)	4,37(4,17)
I · σ ⁻¹	21,26(2,82)	30,80(3,46)	21,96(3,17)
Finaler R-Wert für alle Reflexe (R _{work} /R _{free})	14,85/18,59	17,57/21,03	17,31/21,89
Anzahl Wassermoleküle	263	191	151
Ramachandran-Diagramm:			
Bevorzugte Regionen in %	98	97	98
Erlaubte Regionen in %	2	3	2
Verbotene Regionen in %	0	0	0
Durchschnittliche B-Werte in Å ² für:			
Makromolekül	21,74	34,55	29,67
Ligandenatome	Kein Ligand	54,98	30,47
Wassermoleküle	32,46	36,54	29,36
MPD/Cl ⁻	Kein MPD/kein Cl ⁻	37,99/kein Cl ⁻	Kein MPD/kein Cl ⁻
RMSD Bindungslängen in Å	0,011	0,009	0,011
RMSD Bindungswinkel in °	1,08	0,98	1,01

Datensatz	6EM2	6EM6	6EM7
Wellenlänge in Å	0,918400	0,918400	0,918400
Raumgruppe	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)
Einheitszellkonstanten: a, b, c	52,27/71,97/97,98	70,43/73,16/77,04	64,48/80,01/84,30
Auflösung in Å	1,30	1,64	1,24
Höchste Auflösungsschale in Å	1,38-1,30	1,74-1,64	1,24-1,31
Anzahl einzigartiger Reflexe	91364	49359	122237
R _{sym} in %	4,4(50,4)	4,1(49,3)	4,0(48,7)
Vollständigkeit in %	99,4(97,5)	99,1(97,5)	98,4(96,1)
Redundanz	5,05(4,80)	5,86(5,83)	4,42(4,30)
I · σ ⁻¹	19,00(3,05)	23,98(3,60)	19,02(2,83)
Finaler R-Wert für alle Reflexe (R _{work} /R _{free})	13,24/15,25	17,44/19,09	13,85/15,65
Anzahl Wassermoleküle	307	219	335
Ramachandran-Diagramm:			
Bevorzugte Regionen in %	98	97	98
Erlaubte Regionen in %	2	3	2
Verbotene Regionen in %	0	0	0
Durchschnittliche B-Werte in Å ² für:			
Makromolekül	15,83	25,57	16,08
Ligandenatome	35,53	20,05	17,71
Wassermoleküle	27,61	30,57	25,55
MPD/Cl ⁻	14,35/kein Cl ⁻	Kein MPD/kein Cl ⁻	26,46/kein Cl ⁻
RMSD Bindungslängen in Å	0,010	0,007	0,009
RMSD Bindungswinkel in °	1,16	0,98	1,15

Datensatz	6EMA	6EMB	6EMC
Wellenlänge in Å	0,918400	0,918400	0,918400
Raumgruppe	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	76(P4 ₁)
Einheitszellkonstanten: a, b, c	68,86/73,43/76,94	58,96/73,89/108,20	83,68/60,27/83,80
Auflösung in Å	1,88	1,75	1,97
Höchste Auflösungsschale in Å	1,99-1,88	1,85-1,75	2,09-1,97
Anzahl einzigartiger Reflexe	32196	48328	29620
R _{sym} in %	4,3(49,5)	4,3(47,9)	4,0(48,7)
Vollständigkeit in %	99,2(99,3)	99,4(98,0)	99,4(98,5)
Redundanz	5,89(6,03)	4,32(4,17)	4,83(4,92)
I · σ ⁻¹	26,64(3,66)	19,05(2,69)	22,78(3,09)
Finaler R-Wert für alle Reflexe (R _{work} /R _{free})	18,22/21,28	17,38/20,66	21,12/24,82
Anzahl Wassermoleküle	120	184	95
Ramachandran-Diagramm:			
Bevorzugte Regionen in %	97	97	98
Erlaubte Regionen in %	3	3	2
Verbotene Regionen in %	0	0	0
Durchschnittliche B-Werte in Å ² für:			
Makromolekül	32,75	34,05	39,96
Ligandenatome	27,09	26,40	36,09/37,29
Wassermoleküle	32,90	34,91	36,20
MPD/Cl ⁻	Kein MPD/kein Cl ⁻	Kein MPD/kein Cl ⁻	Kein MPD/kein Cl ⁻
RMSD Bindungslängen in Å	0,007	0,010	0,007
RMSD Bindungswinkel in °	0,82	0,99	0,77

Datensatz	6EMD	6EME	6ERS
Wellenlänge in Å	0,918400	0,885590	0,918400
Raumgruppe	76(P4 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)
Einheitszellkonstanten: a, b, c	83,90/83,90/60,36	58,47/71,70/109,61	69,34/73,08/77,18
Auflösung in Å	1,91	1,68	1,82
Höchste Auflösungsschale in Å	2,02-1,91	1,78-1,68	1,93-1,82
Anzahl einzigartiger Reflexe	32638	53307	35803
R _{sym} in %	4,5(52,2)	6,6(49,8)	8,2(52,2)
Vollständigkeit in %	99,7(99,0)	99,9(99,2)	99,8(99,5)
Redundanz	6,83(6,93)	7,39(7,28)	5,49(5,51)
I · σ ⁻¹	24,28(4,08)	15,16(3,05)	13,29(2,91)
Finaler R-Wert für alle Reflexe (R _{work} /R _{free})	18,87/22,23	18,20/20,20	18,52/22,13
Anzahl Wassermoleküle	111	196	141
Ramachandran-Diagramm:			
Bevorzugte Regionen in %	97	98	98
Erlaubte Regionen in %	3	2	2
Verbotene Regionen in %	0	0	0
Durchschnittliche B-Werte in Å ² für:			
Makromolekül	41,40	29,63	26,70
Ligandenatome	40,26	35,88	23,13
Wassermoleküle	38,34	32,90	29,13
MPD/Cl ⁻	Kein MPD/kein Cl ⁻	Kein MPD/41,73	Kein MPD/kein Cl ⁻
RMSD Bindungslängen in Å	0,011	0,007	0,010
RMSD Bindungswinkel in °	1,22	0,90	1,00

Datensatz	6ERT	6ERU	6ERV
Wellenlänge in Å	0,918400	0,918400	0,918400
Raumgruppe	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)
Einheitszellkonstanten: a, b, c	68,86/73,26/77,15	58,71/72,90/112,81	58,98/72,91/109,48
Auflösung in Å	1,80	2,15	2,06
Höchste Auflösungsschale in Å	1,91-1,80	2,28-2,15	2,18-2,06
Anzahl einzigartiger Reflexe	36578	26202	29607
R _{sym} in %	4,3(50,3)	5,2(49,5)	4,6(49,4)
Vollständigkeit in %	98,8(97,4)	99,2(98,4)	98,8(98,7)
Redundanz	4,33(4,42)	4,70(4,77)	4,42(4,58)
I · σ ⁻¹	20,54(2,97)	21,13(3,02)	20,00(3,16)
Finaler R-Wert für alle Reflexe (R _{work} /R _{free})	18,42/21,85	20,52/24,48	17,92/21,75
Anzahl Wassermoleküle	139	65	177
Ramachandran-Diagramm:			
Bevorzugte Regionen in %	97	96	97
Erlaubte Regionen in %	3	4	3
Verbotene Regionen in %	0	0	0
Durchschnittliche B-Werte in Å ² für:			
Makromolekül	31,68	45,89	43,65
Ligandenatome	27,82	Kein Ligand	Kein Ligand
Wassermoleküle	34,46	38,00	44,90
MPD/Cl ⁻	Kein MPD/kein Cl ⁻	Kein MPD/kein Cl ⁻	54,08/kein Cl ⁻
RMSD Bindungslängen in Å	0,011	0,008	0,012
RMSD Bindungswinkel in °	0,98	0,80	1,08

Datensatz	6ERW	6ESA
Wellenlänge in Å	0,918400	0,918400
Raumgruppe	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	19(P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)
Einheitszellkonstanten: a, b, c	58,62/71,70/109,78	64,94/80,33/85,00
Auflösung in Å	1,89	1,31
Höchste Auflösungsschale in Å	2,00-1,89	1,39-1,31
Anzahl einzigartiger Reflexe	37721	106860
R _{sym} in %	9,8(49,6)	3,6(49,1)
Vollständigkeit in %	99,3(98,0)	99,0(96,3)
Redundanz	5,10(5,03)	4,39(4,38)
I · σ ⁻¹	10,44(3,45)	21,79(3,21)
Finaler R-Wert für alle Reflexe (R _{work} /R _{free})	19,28/22,92	13,09/14,66
Anzahl Wassermoleküle	178	333
Ramachandran-Diagramm:		
Bevorzugte Regionen in %	97	98
Erlaubte Regionen in %	3	2
Verbotene Regionen in %	0	0
Durchschnittliche B-Werte in Å ² für:		
Makromolekül	30,76	17,08
Ligandenatome	27,21	13,00
Wassermoleküle	33,79	27,47
MPD/Cl ⁻	35,65/kein Cl ⁻	29,25/kein Cl ⁻
RMSD Bindungslängen in Å	0,006	0,011
RMSD Bindungswinkel in °	0,79	1,17

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Erkennen von Proteinoberflächen durch ungewöhnliche Substrat-analoge Inhibitoren am Beispiel der cAMP-abhängigen Proteinkinase A“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 31.10.2017

Janis Müller